

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第5749330号

(P 5 7 4 9 3 3 0)

(45)発行日 平成27年7月15日(2015.7.15)

(24)登録日 平成27年5月22日(2015.5.22)

(51)Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/28 (2006.01)

C O 7 K 16/28 Z N A

C O 7 K 16/46 (2006.01)

C O 7 K 16/46

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数18 (全92頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2013-501835(P2013-501835)
(86)(22)出願日 平成23年3月30日(2011.3.30)
(65)公表番号 特表2013-523106(P2013-523106A)
(43)公表日 平成25年6月17日(2013.6.17)
(86)国際出願番号 PCT/EP2011/054945
(87)国際公開番号 W02011/121040
(87)国際公開日 平成23年10月6日(2011.10.6)
審査請求日 平成25年11月18日(2013.11.18)
(31)優先権主張番号 12/749,891
(32)優先日 平成22年3月30日(2010.3.30)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 10290167.5
(32)優先日 平成22年3月30日(2010.3.30)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

早期審査対象出願

(73)特許権者 500033483
ピエール、ファーブル、メディカマン
フランス国ブローニュ、ビヤンクール、ブ
ラス、アベル、ガンス、45
(74)代理人 100117787
弁理士 勝沼 宏仁
(74)代理人 100091487
弁理士 中村 行孝
(74)代理人 100107342
弁理士 横田 修孝
(74)代理人 100111730
弁理士 伊藤 武泰
(74)代理人 100126099
弁理士 反町 洋

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 癌を治療するためのヒト化抗CXCR4抗体

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

CXCR4に特異的に結合しうるヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片であって、前記ヒト化抗体またはその機能的断片の誘導化合物が重鎖および軽鎖を含んでなり、前記重鎖がCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3からなるCDRを有し、前記軽鎖がCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3からなるCDRを有し、前記CDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3がそれぞれ配列番号4、5および6の配列を含んでなり、前記CDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3がそれぞれ配列番号7、8および9の配列を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片。

【請求項2】

配列番号10、11、12、13、83、85または87からなる群から選択される配列の重鎖可変領域および配列番号14、15、16、17、18、19、20、84、86または88からなる群から選択される配列の

2

軽鎖可変領域を含んでなる、請求項1に記載のヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片。

【請求項3】

配列番号21、22、23、24、89または91からなる群から選択される配列の重鎖および配列番号25、26、27、28、29、30、31、90または92からなる群から選択される配列の軽鎖を含んでなる、請求項1に記載のヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片。

【請求項4】

以下からなる群から選択される、請求項1に記載のヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片：

—配列番号11の配列の重鎖可変領域および配列番号16の配列の軽鎖可変領域を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片；

—配列番号22の配列の重鎖および配列番号27の配列の軽鎖を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片；

—配列番号11の配列の重鎖可変領域および配列番号1

4

—配列番号 23 の配列の重鎖および配列番号 92 の配列の軽鎖を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくはは機能的断片；

一配列番号 13 の配列の重鎖可変領域および配列番号 88 の配列の軽鎖可変領域を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくはは機能断片；

一配列番号 24 の配列の重鎖および配列番号 92 の配列の軽鎖を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくはは機能的断片；

—配列番号 87 の配列の重鎖可変領域および配列番号 14 の配列の軽鎖可変領域を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくはは機能的断片；

—配列番号 91 の配列の重鎖および配列番号 25 の配列の軽鎖を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片；

—配列番号 87 の配列の重鎖可変領域および配列番号 15 の配列の軽鎖可変領域を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片；

—配列番号 91 の配列の重鎖および配列番号 26 の配列の軽鎖を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくはは機能的断片；

—配列番号 87 の配列の重鎖可変領域および配列番号 16 の配列の軽鎖可変領域を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片；

—配列番号 91 の配列の重鎖および配列番号 27 の配列の軽鎖を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくはは機能的断片；

—配列番号 87 の配列の重鎖可変領域および配列番号 17 の配列の軽鎖可変領域を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片；

—配列番号 91 の配列の重鎖および配列番号 28 の配列の軽鎖を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくはは機能的断片；

—配列番号 87 の配列の重鎖可変領域および配列番号 18 の配列の軽鎖可変領域を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片；

—配列番号 91 の配列の重鎖および配列番号 29 の配列の軽鎖を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片；

—配列番号 87 の配列の重鎖可変領域および配列番号 19 の配列の軽鎖可変領域を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片；

—配列番号 91 の配列の重鎖および配列番号 30 の配列の軽鎖を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくはは機能的断片；

—配列番号 87 の配列の重鎖可変領域および配列番号 20 の配列の軽鎖可変領域を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片；

一配列番号 91 の配列の重鎖および配列番号 31 の配列の軽鎖を含んでなる、ヒト化抗体またはその誘導化合物

5

もしくは機能的断片。

【請求項 5】

以下の核酸から選択される、単離された核酸分子：

a) 請求項 1～4 のいずれか一項に記載のヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片をコードする核酸、DNA または RNA ；

b) a) に記載の核酸に相補的な核酸。

【請求項 6】

以下からなる群から選択される核酸配列を含んでなる、請求項 5 に記載の単離された核酸分子：

—ヒト化抗体の重鎖可変領域をコードする核酸配列であって、前記重鎖可変領域のヌクレオチド配列が、配列番号 3 2 の CDR-H1 スクレオチド配列、配列番号 3 3 の CDR-H2 スクレオチド配列および配列番号 3 4 の CDR-H3 スクレオチド配列を含んでなる、核酸配列；

—ヒト化抗体の軽鎖可変領域をコードする核酸配列であって、前記軽鎖可変領域のヌクレオチド配列が、配列番号 3 5 または 6 0 の CDR-L1 スクレオチド配列、配列番号 3 6 または 6 1 の CDR-L2 スクレオチド配列および配列番号 3 7 または 6 2 の CDR-L3 スクレオチド配列を含んでなる、核酸配列；および

—ヒト化抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードする核酸配列であって、
(i) 前記重鎖可変領域のヌクレオチド配列が、配列番号 3 2 の CDR-H1 スクレオチド配列、配列番号 3 3 の CDR-H2 スクレオチド配列および配列番号 3 4 の CDR-H3 スクレオチド配列を含んでなり；

(i i) 前記軽鎖可変領域のヌクレオチド配列が、配列番号 3 5 または 6 0 の CDR-L1 スクレオチド配列、配列番号 3 6 または 6 1 の CDR-L2 スクレオチド配列および配列番号 3 7 または 6 2 の CDR-L3 スクレオチド配列を含んでなる、核酸配列。

【請求項 7】

請求項 5 または 6 に記載の核酸で構成される、ベクター。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のベクターを含んでなる、宿主細胞。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のベクターで形質転換された細胞を含んでなる、ヒト以外のトランスジェニック動物。

【請求項 10】

以下の工程を含む、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片を産生する方法：

—請求項 8 に記載の宿主細胞を培地および前記宿主細胞に適した培養条件で培養する工程；および

—産生された前記抗体またはその機能的断片の 1 つを、前記培養培地または前記培養細胞から回収する工程。

【請求項 11】

請求項 1～4 のいずれか一項に記載のヒト化抗体または

6

その誘導化合物もしくは機能的断片からなる化合物を活性成分として含んでなる、組成物。

【請求項 12】

同時、別個または拡張使用のための組合せ物として CXCR4 に対する抗体以外の抗腫瘍抗体を更に含んでなることを特徴とする、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

同時、別個または拡張使用のための組合せ物または接合物として細胞毒性薬剤および／または細胞分裂阻害剤、細胞毒および／またはラジオアイソトープを更に含んでなる、請求項 11 または 12 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

薬物として使用するための、請求項 11～13 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

癌を予防または治療するための、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のヒト化抗体もしくはその誘導化合物もしくは機能的断片および／または請求項 11～13 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

前記癌が、前立腺癌、骨肉腫、肺癌、乳癌、子宮内膜癌、多発性骨髄腫、卵巣癌、膵臓癌および結腸癌から選択される癌である、請求項 15 に記載のヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片および／または組成物。

【請求項 17】

対象において CXCR4 を発現する腫瘍の存在および／または位置をインビトロで検出することを補助する方法であって、

(a) 前記対象由来のサンプルを請求項 1～4 のいずれか一項に記載のヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片に接触させ、かつ

(b) 前記抗体と前記サンプルの結合を検出することを含んでなる、方法。

【請求項 18】

少なくとも 1 つの請求項 1～4 のいずれか一項に記載のヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片を含んでなるキットであって、前記抗体が好ましくは標識されている、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ケモカイン受容体 (CXCR) に特異的に結合できる新規な抗体、特にヒト化モノクローナル抗体ならびにそのような抗体をコードするアミノ酸配列および核酸配列に関する。一態様から、本発明は、CXCR4 に特異的に結合でき且つ強力な抗腫瘍活性を有する新規な抗体、誘導化合物または機能的断片に関する。また、本発明は、がんの予防的および／または治療的治療のた

めの薬物としてのならびにがんの診断に関連する方法またはキットにおける、そのような抗体の使用を含んでなる。最後に、本発明は、抗体、細胞毒性薬剤／細胞分裂阻害性の毒素等のその他の抗がん化合物と組み合わせたそのような抗体を含んでなる組成物ならびに特定のがんの予防および／または治療のためのその使用を含んでなる。

【背景技術】

【0002】

ケモカインは、特に免疫応答中のケモカイン勾配として知られるリガンドの化学的勾配に沿った白血球の遊走を制御する小さな分泌型ペプチドである (Zlotnick A. et al., 2000)。これらは、NH₂ 末端システイン残基の位置に基づいて2つの主要なサブファミリー、CCおよびCXCに分類され、その2つの主要なサブファミリーがCCRおよびCXCRと命名されているGタンパク質共役受容体に結合する。50種類を超えるヒトケモカインおよび18種類のケモカイン受容体がこれまでに発見されている。

【0003】

多くのがんが、腫瘍の免疫細胞浸潤ならびに腫瘍細胞の成長、生存、遊走、および血管形成に影響を与える複雑なケモカインネットワークを有する。免疫細胞、内皮細胞および腫瘍細胞は、それら自体がケモカイン受容体を発現し、ケモカイン勾配に応答することができる。ヒトがん生検サンプルおよびマウスがんモデルの研究により、がん細胞のケモカイン受容体発現が転移能の上昇に関連することが示されている。様々な種類のがんに由来する悪性細胞が様々なケモカイン受容体発現プロファイルを示すが、ケモカイン受容体4 (CXCR4) が最も多く見られる。上皮、間葉および造血起源の少なくとも23種類の異なる種類のヒトがん細胞がCXCR4受容体を発現する (Balkwill F. et al., 2004)。

【0004】

ケモカイン受容体4 (フーシン、CD184、LESTRまたはHUMSTRとしても知られる) は352または360アミノ酸を含んでなる2種類のアイソフォームとして存在する。残基Asn11がグリコシル化されており、残基Tyr21が硫酸基の付加によって修飾されており、Cys109および186が受容体の細胞外部分でジスルフィドブリッジにより結合している (Juarez J. et al., 2004)。

【0005】

この受容体は、様々な種類の正常組織、ナイーブ非記憶T細胞、制御性T細胞、B細胞、好中球、内皮細胞、一次単球、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、CD34+造血幹細胞によって、ならびに心臓、結腸、肝臓、腎臓および脳において低レベルで発現される。

CXCR4は、白血球の輸送、B細胞リンパ球新生および骨髓造血において重要な役割を果たしている。

【0006】

CXCR4受容体は、結腸癌 (Ottaiano A. et al., 2004)、乳癌 (Kato M. et al., 2003)、前立腺癌 (Sun Y.X. et al., 2003)、肺癌 [小細胞癌および非小細胞癌 (Phillips R.J. et al., 2003)]、卵巣癌 (Scottot n C.J. et al., 2002)、膵臓癌 (Koshiba T. et al., 2000)、腎臓癌、脳癌 (Barbero S et al., 2002)、膠芽腫、リンパ腫等これらに限定されない多くのがんで過剰発現される。

【0007】

これまでに報告されているCXCR4受容体のユニークなリガンドはストロマ細胞由来因子1 (SDF-1) またはCXCL12である。SDF-1は、リンパ節、骨髓、肝臓、肺において多量に、また腎臓、脳および皮膚でそれより少量分泌される。CXCR4は、拮抗するケモカインであるヒトヘルペスウイルスII型にコードされるウイルスマクロファージ炎症性タンパク質II (vMIP-II) によっても認識される。

【0008】

CXCR4/SDF-1軸は、がんにおいて重要な役割を果たしており、転移につながる遊走、侵入に直接関与している。実際に、がん細胞はCXCR4受容体を発現し、遊走して全身循環に入る。その後、がん細胞は、高レベルのSDF-1を産生する臓器の血管床に止まり、そこで増殖し、血管形成を誘導し、転移性腫瘍を形成する (Murphy PM., 2001)。この軸は、細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) 経路 (Barbero S. et al., 2003) および血管形成 (Romagnai P., 2004) の活性化を介した細胞増殖にも関与する。実際、CXCR4受容体およびそのリガンドSDF-1は、VEGF-A発現を刺激することによって血管形成を明らかに促進し、それによりCXCR4/SDF-1の発現が増加する (Bachel der R.E. et al., 2002)。腫瘍関連マクロファージ (TAM) が、腫瘍の低酸素領域に蓄積され、刺激されて、腫瘍細胞と協同して血管形成を促進することも知られている。低酸素症がTAMを初めとする種々の種類の細胞におけるCXCR4の発現を選択的にアップレギュレートすることが観察されている (Mantovani A. et al., 2004)。

最近、CXCR4/SDF-1軸がCXCR4+造血幹／前駆細胞 (HSC) の輸送／ホーミングを制御し、血管新生において何らかの役割を果たし得ることが示された。HSCに加え、機能的CXCR4は他の組織由来の幹細胞 (組織コミット幹細胞=TCSC) 上でも発現するので、SDF-1は臓器／組織再生に必要なCXCR4+ TCSCの化学誘引において重要な役割を果たし得るが、これらのTCSCはがん発生の細胞的起源でもあり得ること (がん幹細胞理論) が示されている。幹細胞起源のがんは、ヒト白血病および最近になって脳腫瘍や乳がん等の複数の固形腫瘍で示されている。白血病、

脳腫瘍、小細胞肺癌、乳癌、肝芽腫、卵巣癌、子宮頸癌等の正常なCXCR4+組織/臓器特異的幹細胞に由来し得るCXCR4+腫瘍が数例ある (Kucia M. et al., 2005)。

【0009】

CXCR4受容体に対するモノクローナル抗体を用いてCXCR4受容体に干渉することによるインビボでのがん転移ターゲティングが示されている (Muller A. et al., 2001)。簡潔に述べると、CXCR4受容体に対するモノクローナル抗体 (Mab 173、R&Dシステムズ社) が、SCIDマウスの同所性乳癌モデル (MDA-MB231) においてリンパ節転移の数を有意に減少させることが示された。別の研究 (Phillips R.J et al., 2003) でも、SDF-1に対するポリクローナル抗体を用いて、同所性肺癌モデル (A549) の転移におけるSDF-1/CXCR4軸の重大な役割が示されたが、この研究では腫瘍の成長にも血管形成にも影響がなかった。他の複数の研究で、CXCR4の2本鎖siRNA (Liang Z. et al., 2005)、生体内で安定なCXCR4ペプチドアンタゴニスト (Tamamura H. et al., 2003) を用いたインビボでの転移阻害またはAMD3100 (Rubin J.B. et al., 2003およびDe Falco V. et al., 2007) もしくはMab (国際公開第2004/059285 (A2) 号パンフレット) のようなCXCR4の小分子アンタゴニストを用いたインビボでの腫瘍成長の阻害も示されている。したがって、CXCR4はがんについての検証済みの治療標的である。

【0010】

もう1つのケモカイン受容体であるケモカイン受容体2 (CXCR2) も腫瘍学における興味深い標的であることが報告されている。実際、CXCR2は、複数の種類の腫瘍細胞で自己分泌細胞成長シグナルを伝達し、血管形成を促進することにより間接的に腫瘍増殖に影響を与えることもできる (Tanaka T. et al. 2005)。

【0011】

CXCR2ケモカイン受容体は360個のアミノ酸を含む。これは、主に内皮細胞中で、特に血管新生中に、発現される。複数のケモカインがCXCR2受容体に結合する: ERL+血管形成促進ケモカインに属するCXCL5、-6、-7、IL-8、GRO- α 、- β および- γ 。CXCR2受容体はCXCR4受容体と配列相同性を有し、配列同一性が37%、配列相同性が48%である。CXCR2/リガンド軸は、転移 (Singh RK. et al., 1994)、細胞増殖 (Owen J.D. et al., 1997) 等の複数の腫瘍成長機構およびERL+ケモカイン仲介血管形成 (Strieter R.M. et al., 2004およびRomagnani et al., 2004) に関与する。最後に、腫瘍関連マクロファージおよび好中球が炎症誘導腫瘍成長の重要な要素であり、CXCL5、IL-8、GRO- α 等のケモカインは好中球のリクルートを開始させる。

【0012】

二量体化が、Gタンパク質共役受容体、とりわけケモカイン受容体、の機能を制御する共通の機構であることが明らかになってきた (Wang J. and Norcross M., 2008)。複数のケモカイン受容体によるシグナル伝達の開始および変化に、ケモカインの結合に応答したホモ二量体化およびヘテロ二量体化が必要であることが示されている。受容体の二量体またはオリゴマーがおそらくケモカイン受容体の基本的機能単位であるという概念を裏付ける証拠が集まってきている。ケモカイン受容体二量体はリガンド非存在下で見られ、ケモカインは受容体二量体のコンホメーション変化を誘導する。CXCR4は、ホモ二量体を形成するが、例えば δ オピオイド受容体 (DOR) (Hereld D., 2008) またはCCR2 (Percherancier Y. et al., 2005) とヘテロ二量体も形成することが知られている。

後者の例では、CXCR4の膜貫通ドメインに由来するペプチドが、リガンドに誘導される二量体コンホメーション遷移をブロックすることによって活性化を阻害した (Percherancier Y. et al., 2005)。別の研究では、CXCR4の膜貫通領域の合成ペプチドであるCXCR4-TM4ペプチドが、CXCR4ホモ二量体のプロトマー間でのエネルギー移動を減少させ、悪性細胞においてSDF-1によって誘導される遊走およびアクチン重合化を阻害することが示された (Wang J. et al., 2006)。より最近になって、CXCR7がCXCR4と機能的ヘテロ二量体を形成し、SDF-1によって誘導されるシグナル伝達を促進することも示された (Sierro F. et al., 2007)。他の構成的ヘテロ二量体の例として、CXCR1とCXCR2の相互作用およびそれぞれのホモ二量体形成を示す研究がある。これらのいずれにおいても別のGPCR (α (1A) -アドレナリン受容体) との相互作用は示されておらず、このことは、CXCR1とCXCR2の相互作用の特異性を示している (Wilson S. et al., 2005)。

【0013】

既に述べたように、CXCR4受容体およびCXCR2受容体は興味深い腫瘍標的である。これらの受容体に干渉することで、腫瘍細胞増殖、血管形成、腫瘍細胞の遊走および侵入、腫瘍による好中球およびマクロファージのリクルートが減少することによりならびにCXCR4がん幹細胞が阻害されることにより、非常に効率的に腫瘍の成長および転移が阻害されるはずである。

【0014】

本発明の発明態様の1つは、CXCR4二量体のコンホメーション変化を誘導するヒト化モノクローナル抗体の作製である。本発明は、CXCR4ホモ二量体およびCXCR4/CXCR2ヘテロ二量体の両方に結合でき且つそのコンホメーション変化を誘導でき、強力な抗腫瘍活性を有する、CXCR4 Mab hz515H7 (

11

またはその断片)を包含する。Hz 5 1 5 H 7は、CXCR4ホモ二量体だけでなくCXCR4/CXCR2ヘテロ二量体のコンホメーション変化も誘導する。この新たな特性は、がんにおけるこれら2つのケモカイン受容体の重要な役割を考慮すれば、がん治療用途において興味深いものである。

【0015】

受容体のホモおよびヘテロ二量体の両方のターゲティングがMabの治療効果を増大させることが既に見出されている。実際、例えば、IGF-1Rおよびインスリン 10 /IGF-1ハイブリッド受容体の両方をターゲティングするMab(h7C10)は、IGF-1RのみをターゲティングするMabよりも強力にインビボで腫瘍成長を阻害することが示されている(Pandini G., 2007)。

【0016】

更に、抗CXCR4 Mab h z 5 1 5 H 7は、CXCR4のサイレントアンタゴニストであり、インビトロアッセイにおいて基本的シグナルは変化させないが、種々のアッセイにおいてSDF-1によって誘導されるシ 20 グナル伝達(GTPγS結合、Ca²⁺放出)を阻害し、また、インビトロでSDF-1によって誘導される腫瘍細胞遊走を阻害することができる。

【0017】

部分的アゴニストまたはインバースアゴニストのいずれかとして作用する分子は、リガンド非存在下で固有の活性を示す。これらの種類の分子はリガンドの非存在下でもそれぞれ高親和性または低親和性GPCR状態を安定化し、それによって下流のシグナル伝達カスケードを活性化または阻害する(Galandin et al., 2007; Kenakin 30 , 2004)。

【0018】

h z 5 1 5 H 7 Mabの場合、これは、サイレントアンタゴニストとして振る舞い、SDF-1非存在下ではCXCR4受容体において固有活性を有さない。オピオイド受容体リガンドで既に観察されているように、この薬理学的特徴は、部分的アゴニストまたはインバースアゴニストと比べて少ない副作用に関連付けられると考えられる(Bosier and Hermans, 2007)。実際、h z 5 1 5 H 7 Mabの機能的活性はSDF-1の存在に完全 40 に依存し、SDF-1リガンドの発現、分泌または血流による供給がない組織および臓器ではCXCR4受容体活性の調節は観察されない。したがって、h z 5 1 5 H 7

Mabは、正または負の効果を有する他のCXCR4受容体リガンドよりも毒性が低いと思われる。更に、サイレントアンタゴニストは、薬理学分野で少数である(Wurch et al., 1999, Kenakin, 2004)。

【0019】

驚くべきことに、本発明者らは初めて、CXCR4に結合でき且つCXCR4ホモ二量体および/またはヘテロ 50

12

二量体のコンホメーション変化を誘導できるヒト化抗体の作製に成功した。より具体的には、本発明のヒト化抗体は、CXCR4ホモ二量体のコンホメーション変化だけでなくCXCR4/CXCR2ヘテロ二量体のコンホメーション変化も誘導することができる。

【0020】

以下の説明において、表現「CXCR4二量体」は、CXCR4ホモ二量体およびCXCR4/CXCR2ヘテロ二量体を包含するものと理解されなければならない。

【0021】

このようなヒト化抗体は先行技術中で報告されたことがないことをこの段階で述べておかなければならない。更に、CXCR4/CXCR2ヘテロ二量体の存在が報告されたこともない。

【0022】

本発明の一部は、CXCR4およびCXCR2によって形成されるヘテロ二量体の存在の発見である。

【0023】

したがって、特定の態様によれば、本発明は、CXCR4/CXCR2ヘテロ二量体を含んでなるまたはからなる単離された複合体を開示する。

【0024】

前記CXCR4/CXCR2ヘテロ二量体複合体のCXCR4化合物部分は、以下からなる群から選択される2種類のヒトCXCR4アイソフォームのいずれかである：

—GenBankアクセッション番号NP_003458(配列番号1)に記載の配列を有するケモカイン(C-X-Cモチーフ)受容体4アイソフォームb[ホモサピエンス]；

—GenBankアクセッション番号NP_001008540(配列番号2)に記載の配列を有するケモカイン(C-X-Cモチーフ)受容体4アイソフォームa[ホモサピエンス]；

—配列番号1または2を有するこれらのbまたはaアイソフォームのいずれかと少なくとも95%の同一性を有する、その選択的転写スプライスバリエントまたは天然バリエント；および

—その天然リガンドであるストロマ細胞由来因子-1(SDF-1)によって特異的に認識でき、好ましくは少なくとも100、150および200アミノ酸の長さを有する、その断片。

【0025】

前記CXCR4/CXCR2ヘテロ二量体複合体のCXCR2化合物部分は、以下からなる群から選択される：

—GenBankアクセッション番号NP_001548(配列番号3)に記載の配列を有するインターロイキン8受容体ベータ[ホモサピエンス]；

—配列番号3を有するこのインターロイキン8受容体ベータと少なくとも95%の同一性を有する、その選択的

13

転写スプライスバリエントまたは天然バリエント；および

— I L — 8 によって特異的に認識でき、好ましくは少なくとも 100、150 および 200 アミノ酸の長さを有する、その断片。

【0026】

この特定の態様によれば、本発明は更に、前記 CXCR4/CXCR2 ヘテロ二量体複合体を含んでなるポリペプチドをコードする単離された RNA または DNA を開示する。

【0027】

本発明は更に、前記 CXCR4/CXCR2 ヘテロ二量体複合体をコードする核酸コンストラクト、好ましくはプラスミド等の発現ベクターを開示する。

【0028】

本発明は更に、前記 CXCR4/CXCR2 ヘテロ二量体複合体の CXCR4 部分をコードする少なくとも 1 つの核酸コンストラクト、好ましくはプラスミド等の発現ベクターと前記 CXCR4/CXCR2 ヘテロ二量体複合体の CXCR2 部分をコードする第 2 のコンストラクト、好ましくはプラスミド等の発現ベクターとを含んでなる組成物を含んでなる。

【0029】

この態様によれば、本発明は更に、前記 CXCR4/CXCR2 ヘテロ二量体複合体を発現する組換え宿主細胞を作製する方法であって、

a) 前記 CXCR4/CXCR2 ヘテロ二量体複合体をコードする核酸コンストラクト、好ましくはプラスミド等の発現ベクターで、または

b) 前記 CXCR4/CXCR2 ヘテロ二量体複合体の CXCR4 部分をコードする少なくとも 1 つの核酸コンストラクト、好ましくはプラスミド等の発現ベクターおよび前記 CXCR4/CXCR2 ヘテロ二量体複合体の CXCR2 部分をコードする第 2 のコンストラクト、好ましくはプラスミド等の発現ベクターで、前記宿主細胞を形質転換することを含んでなる、方法を開示する。

【0030】

前記宿主細胞は、哺乳動物細胞等の真核細胞である。

【0031】

前記 CXCR4/CXCR2 ヘテロ二量体複合体をコードする核酸コンストラクトは、CXCR4 配列に（特に共有結合により）結合している luc マーカー等の第 1 のマーカーおよび CXCR2 配列に（特に共有結合により）結合している GFP マーカー（すなわち BRET 分析のため）等の第 2 のマーカーもコードする。

【0032】

本発明は更に、抗がん活性を有する化合物またはがんを治療するための組成物の製造に使用可能な化合物を選択する方法であって、

a) 前記 CXCR4/CXCR2 ヘテロ二量体複合体を

14

発現する本発明の組換え宿主細胞を被験化合物と接触させ、かつ

b) この化合物が組換え宿主細胞中においてこの CXCR4/CXCR2 ヘテロ二量体複合体の活性を調節、好ましくは阻害できるかどうかを決定すること

を含んでなることを特徴とする、方法を開示する。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図 1】図 1 A および図 1 B は、それぞれ、がん細胞における CXCR4 および CXCR2 の発現を qPCR 分析により示す図である。

【図 2】FACS 分析による、がん細胞における CXCR4 および CXCR2 タンパク質の発現を示す図である。

【図 3】図 3 A および図 3 B は、野生型ヒト CXCR4 を安定的に発現する CHO-K1 細胞の細胞膜上における非標識 SDF-1（図 3 A）および 515H7 Mab（図 3 B）による特異的 $[^3H]$ SDF1 結合との競合を示す図である（T：全結合；NS：非特異的結合）。

【図 4】NIH-3T3 細胞中で安定的に発現されている野生型 CXCR4 受容体での $[^3H]$ GTPγS 結合反応をモニタリングすることによる、515H7 Mab による Gタンパク質活性化の調節を示す図である。

【図 5】SDF-1（10 および 100 nM）で刺激された HeLa ヒト腫瘍細胞での $[^3H]$ GTPγS 結合反応をモニタリングすることによる、抗 CXCR4 Mab 515H7 による Gタンパク質活性化の調節を示す図である。

【図 6】図 6 A～図 6 C は、生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）法を用いた、HEK293 細胞における SDF-1 および 515H7 Mab による、CXCR4 受容体と種々の相互作用パートナーとの結合の調節を示す図である（図 6 A：CXCR4：CXCR4 ホモ二量体化、図 6 B：CXCR2：CXCR4 ヘテロ二量体化、図 6 C：CXCR4 により仲介される β アレスチンのリクルート）。

【図 7】図 7 A および図 7 B は、CXCR4 受容体を安定的に発現する NIH3T3 細胞において、SDF-1 および 515H7 Mab による、フォスコリンによって刺激される cAMP 産生の阻害を示す図である。

【図 8】CHO-K1 細胞中で安定的に発現される構成的活性変異体 Asn¹¹⁹ Ser CXCR4 受容体での $[^3H]$ GTPγS 結合反応のモニタリングによる、抗 CXCR4 Mab 515H7 による Gタンパク質活性化の調節を示す図である。

【図 9】CXCR4 Mab 515H7 によるインビトロでの SDF-1 誘導 U937 細胞遊走の阻害を示す図である。

【図 10】Nod/Scid マウスにおいて、抗 CXCR

15

R4 Mab 515H7によるMDA-MB-231異種移植腫瘍成長の阻害を示す図である。

【図11】図11A～図11Cは、CHO-CXCR4細胞（図11A）およびMDA-MB-231（図11B）、U937（図11C）がん細胞における抗CXCR4 Mab 515H7によるSDF-1誘導カルシウム放出の阻害を示す図である。

【図12】U937 Nod/Scidマウス生存モデルにおけるマウス抗CXCR4 Mab m515H7の活性を示す図である。

【図13】Nod/ScidマウスにおいてT細胞KARPAS 299異種移植腫瘍成長の阻害におけるマウス抗CXCR4 Mab m515H7の活性を示す図である。

【図14】野生型ヒトCXCR4を安定的に発現するCHO-K1細胞の細胞膜上におけるマウスm515H7 Mabおよびキメラc515H7 Mabによる特異的^[1 2 5 I] SDF1結合との競合を示す図である（T：全結合；NS：非特異的結合）。

【図15】SDF-1（10 nM）で刺激されたNIH-3T3細胞中で安定的に発現される野生型CXCR4受容体での^[3 5 S] GTPγS結合反応をモニタリングすることによる、マウスm515H7 Mabおよびキメラc515H7 MabによるGタンパク質活性化の調節を示す図である。

【図16】SDF-1（10 nM）で刺激されたHeLaヒト腫瘍細胞での^[3 5 S] GTPγS結合反応をモニタリングすることによる、抗CXCR4 マウスm515H7 Mabおよびキメラc515H7 MabによるGタンパク質活性化の調節を示す図である。

【図17】図17A～図17Cは、生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）法を用いた、HEK293細胞におけるSDF-1ならびにm515H7およびC515H7 Mabによる、CXCR4受容体と種々の相互作用パートナーとの会合の調節を示す図である（図17A：CXCR4：CXCR4ホモ二量体化、図17B：CXCR2：CXCR4ヘテロ二量体化、図17C：CXCR4により仲介されるβアレスチンのリクルート）。

【図18】図18Aおよび図18Bは、CHO-CXCR4細胞（図18A）およびU937細胞（図18B）中におけるSDF-1誘導カルシウム放出の阻害を示す図である。

【図19】抗CXCR4 Mab m515H7およびc515H7による、インビトロでのSDF-1誘導U937細胞遊走の阻害を示す図である。

【図20】U937 Nod/Scidマウス生存モデルにおける抗CXCR4キメラMab c515H7の活性を示す図である。

【図21】515H7重鎖可変ドメインとヒト生殖系列IGHV3-49*04およびIGHJ4*01とのア

16

ミノ酸配列アラインメントを示す図である。515H7

VHアミノ酸配列が、選択されたヒトアクセプターフレームワーク配列とアラインメントされている。VH1およびVH2（VH3は示さず）配列は、515H7 VHドメインの実施されたヒト化バリエーションに対応し、逆変異された残基が太字で示されている。バリエーション1 VH1は逆変異残基を有さず、完全なヒトバリエーションを表す。バリエーションVH2は8個の逆変異を有し、最もマウスに近いバリエーションである。バリエーションVH3は5個の逆変異を有する（示さず）。

【図22】515H7軽鎖とヒト生殖系列IGKV4-1*01およびIGKJ1*01とのアミノ酸配列アラインメントを示す図である。515H7 VLアミノ酸配列が、選択されたヒトアクセプターフレームワーク配列とアラインメントされている。VL1～VL3の配列は、515H7 VLドメインの実施されたヒト化バリエーションに対応し、逆変異された残基が太字で示されている。バリエーションVL1は逆変異残基を有さず、最もヒトに近いバリエーションを表す。バリエーションVL2は13個の逆変異を有し、最もマウスに近いバリエーションである。バリエーションVL3は5個の逆変異を有する。

【図23】図23A～23Fは、ヒト化515H7の種々のバリエーションおよびキメラ515H7による、ビオチン化マウス抗体515H7の交差ブロックを示す図である。515H7のヒト化バリエーション（hz515H7）が元のマウス抗体515H7を交差ブロックする活性を、CXCR4でトランスフェクトされたNIH3T3細胞を用いたフローサイトメトリーで評価した。ヒト化バリエーションの活性をキメラ515H7と比較した。キメラVL（cVL）と組み合わせたVHの3つの異なるバリエーション（VH1～VH3）の交差ブロック活性は非常に類似していた（図23A～図23C）。VLのバリエーション1および2と組み合わせられた時、VHバリエーション1（VH1、逆変異のないバリエーション）では活性が低下しなかった。コンストラクトhz515H7 VH1 VL3では活性の有意な低下が検出された。

【図24】ヒト化抗体515H7バリエーションVH1 VL1の活性を調べるためのBRETアッセイを示す図である。ヒト化バリエーション515H7 VHバリエーション1 VLバリエーション1（hz515H7 VH1 VL1）の活性を、SDF-1仲介シグナル伝達を阻害する能力により評価した。このバリエーションは、BRETによる測定で、SDF-1仲介シグナル伝達の軽度な阻害しか示さなかった。SDF-1は濃度100 nMで用いた。

【図25】図25A～図25Dは、1個または2個の逆変異を有するVH1の種々の変異体および種々のVLバリエーションとhz515H7 VH1 D76Nとの組合せの比較を示す図である。1個および2個の逆変異をVH1中に入れ、VL1と組み合わせた。これらのコンストラクトをBRETアッセイで評価した（図25A～2

17

5C)。これらの逆変異が1個の変異体のうち、逆変異D76Nを有するコンストラクトだけが、SDF-1仲介シグナル伝達の障害増加を示した。VHの逆変異2個の変異体はいずれも強力な阻害活性を有さなかった(図25C)。VH1の逆変異1個の変異体D76NをVLの種々のバリエーションと組み合わせた。SDF-1濃度は100nMとした。

【図26】コンストラクトVH1 D76N VL2と比較した、1個または2個の逆変異を有するVH1およびVL1の種々の変異体の順位を示す図である。VH1中に1個または2個の逆変異を作製し、VL1と組み合わせた。全コンストラクトをBRETアッセイで評価し、阻害率を計算した。SDF-1濃度は100nMとした。

【図27】図27A～図27Bは、ヒト化515H7の種々のコンストラクトによるSDF-1結合の阻害ならびにFACSおよびBRETで得られた結果間の相関を示す図である。βアラブチンのリクルートをブロックする活性が強いヒト化抗体515H7の種々のバリエーションを、ビオチン化SDF-1の結合を阻害する能力についてフローサイトメトリー(FACS)で調べた(A)。それらをVH1およびVL1と比較した。FACSを用いたアッセイから得られた結果はBRETで得られた結果と相関がある(B)。

【図28】hz515H7 VL2ならびに更なるヒト化バージョン515H7 VL2.1、515H7 VL2.2および515H7 VL2.3のアミノ酸配列アラインメントを示す図である。515H7 VLアミノ酸配列が、選択されたヒトアクセプターフレームワーク配列とアラインメントされている。VL2.1、VL2.2およびVL2.3配列は、ヒト化515H7 VL2の実施されたヒト化バリエーションに相当し、逆変異された残基が太字で示されている。VL2.1およびVL2.2は更に4個のヒト化残基を有し、VL2.3は更に5個のヒト化残基を含む。

【図29】図29A～29Cは、NIH3T3-CXCR4(図29A)、U937(図29B)およびRamos細胞(図29C)上での、515H7ヒト化Mab(hz515H7 VH1 D76N VL2、hz515H7 VH1 D76N VL2.1、hz515H7 VH1 D76N VL2.2およびhz515H7 VH1 D76N VL2.3)のCXCR4への特異的結合を示す図である。

【図30】図30A～30Dは、SDF-1(10nMまたは100nM)で刺激されたNIH-3T3細胞で安定的に発現される野生型CXCR4受容体での^[35S]GTPγS結合反応をモニタリングすることによる、ヒト化Mab 515H7(hz515H7 VH1 D76N VL2 [図30A]、hz515H7 VH1 D76N VL2.1 [図30B]、hz515 50

18

H7 VH1 D76N VL2.2 [図30C] およびhz515H7 VH1 D76N VL2.3 [図30D])によるGタンパク質活性化の調節を示す図である。

【図31】図30A～図30Dは、SDF-1(10nMまたは100nM)で刺激されたNIH-3T3細胞で安定的に発現される野生型CXCR4受容体での^[35S]GTPγS結合反応をモニタリングすることによる、ヒト化Mab 515H7(hz515H7 VH1 D76N VL2 [図30A]、hz515H7 VH1 D76N VL2.1 [図30B]、hz515H7 VH1 D76N VL2.2 [図30C] およびhz515H7 VH1 D76N VL2.3 [図30D])によるGタンパク質活性化の調節を示す図である。

【図32】図32A～図32Dは、CHEK293細胞における生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)法を用いた、SDF-1およびヒト化515H7 Mab(hz515H7 VH1 D76N VL2、hz515H7 VH1 D76N VL2.1、hz515H7 VH1 D76N VL2.2およびhz515H7 VH1 D76N VL2.3)による、CXCR4受容体と種々の相互作用パートナーとの会合の調節を示す図である。(図32A: CXCR4: CXCR4ホモ二量体化、図32B: CXCR2: CXCR4ヘテロ二量体化、図32C: CXCR4により仲介されるβアラブチンのリクルート)

【図33】図33A～図33Dは、Glyofixx固定したRAMOSおよびKARPAS299異種移植腫瘍を示す図である。a) およびc) 515H7を用いたIHC染色、b) およびd) mIgG1を用いたIHC染色。

【図34】図34A～図34Dは、ホルムアルデヒド固定したRAMOSおよびKARPAS299異種移植腫瘍を示す図である。a) およびc) 515H7を用いたIHC染色、b) およびd) mIgG1を用いたIHC染色。

【図35】図35A～図35Dは、野生型ヒトCXCR4を安定的に発現するCHO-K1細胞の細胞膜上におけるヒト化hz515H7 Mab(hz515H7 VH1 D76N VL2 [図35A&B]、hz515H7 VH1 D76N VL2.1 [図35A&35C]、hz515H7 VH1 D76N VL2.2 [図35A&35D]、hz515H7 VH1 D76N VL2.3 [図35A])による特異的^[125I]SDF1結合との競合を示す図である(T: 全結合; NS: 非特異的結合)。

【図36】hz515H7 VH1 D76N VL2 MabによるU937細胞におけるSDF-1誘導カルシウム放出の阻害を示す図である。

19

【図37】図37A～図37Bは、CXCR4ヒト化Mab hz515H7 VH1 D76N VL2によるインビトロでのSDF-1誘導U937細胞遊走の阻害を示す図である。

【図38】Glyofixx固定したRAMOSおよびKARPAS299異種移植腫瘍を示す図である。a) およびc) ビオチン化hz515H7 VH1 D76N VL2を用いたIHC染色、b) およびd) ビオチン化hIgG1を用いたIHC染色。

【図39】ホルムアルデヒド固定したRAMOSおよびKARPAS299異種移植腫瘍を示す図である。a) およびc) ビオチン化hz515H7 VH1 D76N VL2を用いたIHC染色、b) およびd) ビオチン化hIgG1を用いたIHC染色。

【図40】ScidマウスにおけるB細胞Ramos異種移植腫瘍成長に対するキメラ515H7 (c515H7) Mabの影響を示す図である。

【図41】ScidマウスにおけるB細胞Ramos異種移植腫瘍成長に対するhz515H7 VH1 D76N VL2 Mabバージョンの影響を示す図である。

【図42】ScidマウスにおけるB細胞Ramos異種移植腫瘍成長に対するhz515H7 VH1 D76N VL2, 1 Mabバージョンの影響を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0034】

第1の態様によれば、本発明の主題は、本発明に係るヒト化抗体の作製および選択プロセスである。

【0035】

第1の態様によれば、本発明は、リガンド依存性およびリガンド非依存性のCXCR4活性化の両方を阻害できる抗CXCR4ヒト化抗体、またはその機能的断片もしくは誘導体の1つ、の選択プロセスであって、以下の工程を含んでなるプロセスに関する：

i) 作製されたヒト化抗体をスクリーニングし、CXCR4に特異的に結合でき且つCXCR4活性化を調節できる抗体を選択する工程；

ii) 工程i) の選択された抗体を試験し、CXCR4ホモ二量体のコンホメーション変化を誘導できる抗体を選択する工程；およびその後

iii) 工程ii) の選択された抗体を試験し、CXCR4/CXCR2ヘテロ二量体のコンホメーション変化を誘導できる抗体を選択する工程。

【0036】

「調節する」という表現は、増加または阻害と理解されなければならない。好ましくは、本発明の選択された抗体は、CXCR4活性化を阻害しなければならない。

【0037】

上記で説明したように、CXCR4二量体コンホメーシ

20

ョン変化の誘導は、そのような抗体がより大きな患者集団に実質的利益を提供するので、本発明の主要な態様である。

【0038】

抗体の作製は、例えば骨髓腫細胞と選択された骨髓腫細胞に適合する免疫化したマウスまたは他の種の脾臓細胞との融合物によって分泌されたマウス抗体のシーケンシングされたCDRからデザインされた組換えヒト化抗体から、当業者に公知の任意の方法により実現することができる (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497)。免疫化した動物としては、ヒト免疫グロブリン座を有して直接ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスが含まれ得る。別の可能な実施形態は、ファージディスプレイ技術を用いてライブラリーをスクリーニングすることにある。

【0039】

スクリーニング工程i) は、当業者に公知の任意の方法またはプロセスによって実現することができる。非限定的な例として、ELISA、BIACore、免疫組織化学、FACS分析および機能的スクリーニングを挙げることができる。好ましいプロセスは、CXCR4形質転換体に対しておよび産生された抗体が腫瘍細胞上の天然受容体も認識できることを確認するために少なくとも1つの腫瘍細胞系に対してFACS分析によりスクリーニングすることにある。このプロセスは以下の実施例により正確に説明する。

【0040】

「CXCR4活性化を調節する」という表現は、後述するマウス抗体についての実施例4、5、7および11、キメラ抗体についての実施例16、17および19、ならびにヒト化抗体についての実施例27、24および28に記載されている活性の少なくとも1つを調節することが意図され、

好ましくは、

—特にヒト野生型CXCR4受容体を安定的に発現するCHO-K1膜等の形質転換真核細胞膜上での競合による、細胞膜の受容体CXCR4上でのリガンドSDF-1の特異的結合 (実施例4、16、27参照) ；

—特に野生型CXCR4受容体膜を安定且つ構造的に発現するNIH-3T3細胞等の形質転換真核細胞膜上での、細胞膜の受容体CXCR4上でのGTPγSの特異的結合 (実施例5、17、24参照) ；

—CXCR4により仲介されるcAMP産生の阻害 (実施例7参照) ；および

—CXCR4受容体により仲介される細胞内カルシウムストアの動員 (実施例11、19、28参照)

を調節することが意図される。

【0041】

より好ましくは、これらの活性の少なくとも1つのこの調節は活性の阻害である。

21

【0042】

本発明のプロセスの選択工程 i i) および i i i) の好ましい実施形態では、前記工程 i i) および i i i) は、それぞれ C X C R 4 - R L u c / C X C R 4 - Y F P および C X C R 4 - R L u c / C X C R 2 - Y F P を発現する細胞の B R E T 分析によって抗体を評価することならびに B R E T シグナルの少なくとも 40%、好ましくは 45%、50%、55%、最も好ましくは 60% を阻害できる抗体を選択することにある。

【0043】

B R E T 法は、タンパク質二量体化を示すことが知られている技術である [Angers et al., PNAS, 2000, 97:3684-89]。

【0044】

本プロセスの工程 i i) および i i i) で使用される B R E T 法は当業者に周知であり、以下の実施例で詳細に説明する。より具体的には、B R E T (生物発光共鳴エネルギー移動) は、生物発光ドナー (ウミシイタケルシフェラーゼ (R l u c)) と蛍光アクセプターである G F P (緑色蛍光タンパク質) または Y F P (黄色蛍光タンパク質) の変異体との間で起こる非放射性的エネルギー移動である。本発明では、E Y F P (高感度黄色蛍光タンパク質) を用いた。移動効果はドナーとアクセプターの配向および距離に依存する。そして、2つの分子が接近 (1~10 nm) している場合のみ、エネルギー移動が起こり得る。この特性を用いて、タンパク質-タンパク質相互作用アッセイを作製する。実際に、2つのパートナー間の相互作用を調べるために、第1のパートナーをウミシイタケルシフェラーゼに、第2のパートナーを G F P の黄色変異体に遺伝的に融合させる。融合タンパク質は、必ずではないが一般的に、哺乳動物細胞中で発現させる。R l u c はその膜透過性基質 (セレンテラジン) の存在下で青色光を発する。G F P 変異体が R l u c から 10 nm よりも近い場合、エネルギー移動が起こり得、追加の黄色シグナルを検出することができる。B R E T シグナルは、アクセプターによって発せられた光とドナーによって発せられた光の比として測定される。したがって、2つの融合タンパク質が接近するか、コンホメーション変化によって R l u c と G F P 変異体が近づくと、B R E T シグナルが増加する。

【0045】

好ましい実施形態に B R E T 分析がある場合、当業者に公知の任意の方法を用いて、C X C R 4 二量体のコンホメーション変化を測定することができる。限定されるものではないが、以下の技術を挙げることができる: F R E T (蛍光共鳴エネルギー移動)、H T R F (均一時間分解蛍光 (Homogenous Time resolved Fluorescence))、F L I M (蛍光寿命画像顕微鏡法) または S W - F C C S 単波長蛍光相互相関分光)。

22

【0046】

共免疫沈降、A l p h a s c r e e n、化学的架橋、二重ハイブリッド、アフィニティークロマトグラフィー、E L I S A またはファウエスタンブロットティング法等のその他の古典的技術も用いることができる。

【0047】

本発明に係るプロセスの特定の態様によれば、工程 i i) は、C X C R 4 - R L u c / C X C R 4 - Y F P の両方を発現する細胞の B R E T 分析により抗体を評価することおよび B R E T シグナルの少なくとも 40% を阻害できる抗体を選択することにある。

【0048】

本発明に係るプロセスの別の特定の態様によれば、工程 i i i) は、C X C R 4 - R L u c / C X C R 2 - Y F P の両方を発現する細胞の B R E T 分析により抗体を評価することおよび B R E T シグナルの少なくとも 40% を阻害できる抗体を選択することにある。

【0049】

第2の態様によれば、本発明の主題は、前記プロセスによって得られる、単離されたヒト化抗体、またはその機能的断片もしくは誘導体の1つ、である。前記ヒト化抗体、またはその前記断片もしくは誘導体の1つは、ヒト C X C R 4 に特異的に結合することができ、また、必要に応じて、好ましくはそれに加えて、そのリガンドの自然な結合を阻害することができ、前記ヒト化抗体は、C X C R 4 二量体のコンホメーション変化を誘導することもできる。

【0050】

「機能的断片および誘導体」という表現は、本明細書において以下で詳細に定義される。

【0051】

ここで、本発明は天然型の抗体に関するものではなく、すなわちそれらは天然環境にはなく、天然供給源から精製によって単離または獲得することができたものであるか、あるいは遺伝的組換えまたは化学合成によって得たものであり、したがって、続けて更に説明されるように、非天然アミノ酸を含んでもよいと理解されなければならない。

【0052】

より具体的には、本発明の別の態様によれば、抗体、またはその機能的断片もしくは誘導体の1つが記載され、前記ヒト化抗体は、配列番号4~9のアミノ酸配列を含んでなる C D R から選択され、I M G T に従って定義される、少なくとも1つの相補性決定領域 C D R を含んでなることを特徴とする。

【0053】

第2の態様によれば、本発明は、配列番号4、5、6、7、8もしくは9の配列の C D R から選択される少なくとも1つの C D R または I M G T による定義で配列が配列番号4、5、6、7、8もしくは9の配列と最適なア

23

ラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する少なくとも1つのCDRを含んでなる単離されたヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0054】

抗体の「機能的断片」とは、特に、元の抗体と同じCXCR4に対する特異性を有する抗体断片、例えば断片Fv、scFv (sc=単鎖)、Fab、F(Ab')₂、Fab'、scFv-Fcもしくは二重特異性抗体 (diabody) または半減期が延長された任意の断片 10 を意味する。そのような機能的断片は、本明細書において以下で更に詳細に説明される。

【0055】

抗体の「誘導化合物」または「誘導体」とは、特に、ペプチドスキャフォールドとそのCXCR4認識能を保存するための元の抗体のCDRの少なくとも1つとで構成される結合タンパク質を意味する。そのような誘導化合物は当業者に周知であり、本明細書において以下で更に詳細に説明される。本発明の別の実施形態では、誘導化合物または誘導体は、元の抗体の少なくとも2、好ましくは少なくとも3、より好ましくは4、更により好ましくは5、最も好ましくは6個のCDRを含んでなり得る。

【0056】

より好ましくは、本発明は、遺伝的組換えまたは化学合成によって得られる、本発明に係るヒト化抗体、その誘導化合物またはその機能的断片を含んでなる。

【0057】

好ましい実施形態では、本発明に係るヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片は、モノクローナル 30 抗体からなることを特徴とする。

【0058】

「モノクローナル抗体」とは、ほぼ均一な抗体集団から生じた抗体を意味すると理解される。より具体的には、集団の個々の抗体は、最小限の割合で見出すことのできる少数の可能な天然の変異を除き、同一である。換言すると、モノクローナル抗体は、単細胞クローン (例えば、ハイブリドーマ、均一な抗体をコードするDNA分子でトランスフェクトされた真核宿主細胞、均一な抗体をコードするDNA分子でトランスフェクトされた原核宿主細胞等) の増殖により生じる均一抗体からなり、一般的に、ただ1つのクラスおよびサブクラスの重鎖ならびに1種類だけの軽鎖を特徴とする。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、単一の抗原に対するものである。更に、種々の決定基またはエピトープに対する種々の抗体を通常含むポリクローナル抗体標品とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原の1つのエピトープに対するものである。

【0059】

ここで、本発明は天然型のヒト化抗体に関するものでは 50

24

なく、すなわち天然環境から取られるものではなく天然供給源から精製によって単離または獲得されるか、あるいは遺伝的組換えまたは化学合成によって得られるものであり、したがって後述するように非天然アミノ酸を有してよいと理解されなければならない。

【0060】

より具体的には、本発明の好ましい実施形態によれば、ヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片は、配列番号4、5もしくは6のアミノ酸配列のCDRから選択される少なくとも1つのCDRまたは配列が配列番号4、5もしくは6の配列と最適なアラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する少なくとも1つのCDRを含んでなる重鎖を含んでなること；あるいは配列番号7、8もしくは9のアミノ酸配列のCDRから選択される少なくとも1つのCDRまたは配列が配列番号7、8もしくは9の配列と最適なアラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する少なくとも1つのCDRを含んでなる軽鎖を含んでなることを特徴とする。

【0061】

好ましい様式では、本発明のヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的断片の1つは、以下の3つのCDR、それぞれCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3、を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とする：

—CDR-H1は、配列番号4の配列または配列番号4と最適なアラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列を含んでなり；

—CDR-H2は、配列番号5の配列または配列番号5と最適なアラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列を含んでなり；

—CDR-H3は、配列番号6の配列または配列番号6と最適なアラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列を含んでなる。

【0062】

特定の実施形態によれば、抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的断片の1つは、配列番号4の配列のCDR-H1、配列番号5の配列のCDR-H2、および配列番号6の配列のCDR-H3を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とする。

【0063】

更により好ましくは、本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的断片の1つは、以下の3つのCDR、それぞれCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖を含んでなることを特徴とする：

—CDR-L1は、配列番号7の配列または配列番号7

25

の配列と最適なアラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列を含んでなり；

—CDR—L2は、配列番号8の配列または配列番号8の配列と最適なアラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列を含んでなり；

—CDR—L3は、配列番号9の配列または配列番号9の配列と最適なアラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列を含んでなる。 10

【0064】

特定の実施形態によれば、抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的断片の1つは、配列番号7の配列のCDR—L1、配列番号8の配列のCDR—L2、および配列番号9の配列のCDR—L3を含んでなる軽鎖を含んでなることを特徴とする。

【0065】

本明細書中、「ポリペプチド」、「ポリペプチド配列」、「ペプチド」および「抗体化合物にまたはその配列に結合しているタンパク質」という用語は同義である。 20

【0066】

ここで、本発明は天然型の抗体に関するものではなく、すなわち、天然環境から取られるものではなく天然供給源から精製によって単離または獲得されるか、あるいは遺伝的組換えまたは化学合成によって得られるものであり、したがって後述するように非天然アミノ酸を有してよいと理解されなければならない。

【0067】

IMGTの固有なナンバリングは、抗原受容体、鎖型、または種に関わらず可変ドメインを比較するために定義されたものである [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommie, C, Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]。IMGTの固有なナンバリングでは、保存されているアミノ酸は常に同じ位置になる：例えばシステイン23 (1st-CYS)、トリプトファン41 (CONSERVED-TRP)、疎水性アミノ酸89、システイン104 (2nd-CYS)、フェニルアラニンまたはトリプトファン118 (J-PHEまたはJ-TRP) である。IMGTの固有なナンバリングは、フレームワーク領域 (FR1-IMGT: 1~26位、FR2-IMGT: 39~55位、FR3-IMGT: 66~104位およびFR4-IMGT: 118~128位) および相補性決定領域: CDR1-IMGT: 27~38、CDR2-IMGT: 56~65およびCDR3-IMGT: 105~117の標準化された境界を与える。ギャップは非占有位置を表すので 50

26

、CDR—IMGT長 (かぎ括弧中に示されドットで区切られる。例えば [8. 8. 13]) は重要な情報となる。IMGTの固有なナンバリングは、IMGT Collie rs de Perlesと呼ばれる2Dグラフィック表示 [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)] およびIMGT/3Dstructure-DBの3次元構造 [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)] に用いられる。

【0068】

3つの重鎖CDRおよび3つの軽鎖CDRが存在する。本明細書において、CDRという用語は、状況に応じて、抗体が認識する抗原またはエピトープに対する抗体の親和性による結合を担うアミノ酸残基の大部分を含むこれらの領域の1つまたはこれらの領域の複数もしくは全部を指すために使用される。

【0069】

本発明において、核酸またはアミノ酸の2つの配列間の「同一性パーセンテージ」とは、最適なアラインメント後に得られる、比較される2つの配列間で同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基のパーセンテージを意味し、このパーセンテージは完全に統計的であり、2つの配列の間の差はその全長に渡ってランダムに分布される。2つの核酸またはアミノ酸配列の比較は、従来、それらの最適なアラインメント後に配列を比較することによって行われ、前記比較は、セグメントによってまたは「アラインメントウィンドウ」を用いて行うことができる。比較のための配列の最適なアラインメントは、手作業での比較の他に、Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482]の局所相同性アルゴリズムを用いて、Neddleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443]の局所相同性アルゴリズムを用いて、Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444]の類似性サーチ法を用いてまたはこれらのアルゴリズムを用いたコンピューターソフトウェア (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) のGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA、または比較ソフトウェアBLAST NRもしくはBLAST P) を用いて行うことができる。

【0070】

2つの核酸またはアミノ酸配列間の同一性パーセンテージは、2つの最適にアラインメントされた配列を比較することにより決定され、ここで、比較される核酸またはアミノ酸配列は、2つの配列間での最適なアラインメントのための参照配列と比較して付加または欠失を有し得る。同一性パーセンテージは、2つの配列間で、好ましくは2つの完全配列間で、アミノ酸ヌクレオチドまたは

27

残基が同一の箇所の数を決定し、この同一箇所数をアラインメントウィンドウ中の箇所の総数で割り、その結果に100を掛けて2つの配列間の同一性パーセンテージを得ることにより計算される。

【0071】

例えば、サイト<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>で利用可能なBLASTプログラム「BLAST 2 Sequences」(Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174:247-250)をデフォルトのパラメーター（特にパラメーター、「オープン・ギャップ・ペナルティ」：5、「エクステンション・ギャップ・ペナルティ」：2について；選択されるマトリックスは、例えばプログラムによって提案される「BLOSUM 62」マトリックス）で使うことができ、このプログラムにより、比較する2つの配列間の同一性パーセンテージが直接計算される。

【0072】

参照アミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を示すアミノ酸配列の好ましい例として、参照配列、特定の修飾、特に少なくとも1つのアミノ酸の欠失、付加もしくは置換、切断または伸張を含むものが含まれる。

1または複数の連続または非連続アミノ酸の置換の場合、置換は、置換されるアミノ酸が「同等な(equivalent)」アミノ酸により置換される置換が好ましい。ここで、「同等なアミノ酸」という表現は、構造的アミノ酸の1つを置換でき、対応する抗体および後述する具体例の生物学的活性を変化させないと考えられる、任意のアミノ酸を指すものとする。

【0073】

同等なアミノ酸は、それらで置換されるアミノ酸とそれらの構造的相同性に基づいてまたは生成されるであろう種々の抗体間の生物学的活性の比較試験の結果に基づいて決定することができる。

【0074】

非限定的な例として、対応する修飾抗体の生物学的活性を大きく変えずに行うことができると考えられる、可能性のある置換を以下の表1にまとめる。同じ条件下で逆置換が当然可能である。

【0075】

【表1】

28

表1

元の残基	置換残基
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

【0076】

当該技術分野の現在の状況では、6つのCDR中の最大の変異性（長さおよび組成）は3つの重鎖CDR、より具体的にはこの重鎖のCDR-H3に見られることが当業者に知られている。したがって、本発明の抗体の、またはその誘導化合物もしくは機能的断片の1つの、好ましい特徴的なCDRが重鎖の3つのCDRとなることは明らかであろう。

【0077】

本発明の別の実施形態では、

以下の3つのCDRを含んでなる重鎖：

配列番号4の配列または配列番号4の配列と最適なアラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-H1；

配列番号5の配列または配列番号5の配列と最適なアラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-H2；

配列番号6の配列または配列番号6の配列と最適なアラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-H3；および

以下の3つのCDRを含んでなる軽鎖：

配列番号7の配列または配列番号7の配列と最適なアラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-L1；

配列番号8の配列または配列番号8の配列と最適なアラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-L2；

配列番号9の配列または配列番号9の配列と最適なアラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-L3；

を含んでなる抗体またはその誘導化合物もしくは機能的

29

断片が開示される。

【0078】

本発明の別の態様は、上記ヒト化抗体の機能的断片に関する。当業者に明らかなように、機能的断片は必ず、結合断片、すなわち元の抗体と同じ標的に結合できる断片である。

更に、機能的断片は、元の抗体の機能を保持している。特に、本発明の機能的断片はCXC R4の活性化を調節することができる。より好ましくは、本発明に係る機能的断片はCXC R4の活性化を阻害することができる。一実施形態では、CXC R4活性化はリガンド依存的であり、別の実施形態では、前記CXC R4活性化はリガンド非依存的である。

【0079】

好ましい実施形態では、本発明の機能的断片は、CXC R4/CXC R2ヘテロ二量体複合体の活性を調節することにある元の抗体の機能を保持している。好ましくは、前記機能的断片は、CXC R4/CXC R2ヘテロ二量体複合体の活性を阻害する能力を保持している。

【0080】

より具体的には、本発明は、前記機能的断片が、断片Fv、Fab、(Fab')₂、Fab'、scFv、scFv-Fcおよび二重特異性抗体；またはペグ化断片等の半減期が延長された任意の断片から選択されることを特徴とする、抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0081】

本発明に係る抗体のそのような機能的断片は、例えば、断片Fv、scFv (sc=単鎖)、Fab、F(Ab')₂、Fab'、scFv-Fcまたは二重特異性抗体、あるいはポリエチレングリコール等のポリアルキレングリコールの付加 (ペグ化) (ペグ化断片はFv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(Ab')₂-PEGおよびFab'-PEGと呼ばれる) 等の化学修飾によりまたはリポソーム、マイクロスフェアもしくはPLGA中への組込みにより半減期が延長された任意の断片からなり、前記断片は、特にそれが由来する抗体の一般的様式の活性を一部であれ発揮できる本発明のヒト化抗体の特徴的CDRの少なくとも1つを有する。

【0082】

好ましくは、前記機能的断片は、それらが由来する抗体の重鎖または軽鎖の変換部の部分的配列を含んでなるか含み、前記部分的配列は、それが由来する抗体と同じ結合特異性および十分な親和性、好ましくはそれが由来する抗体の親和性の1/10に少なくとも等しい親和性、より好ましくは少なくとも1/10の親和性を保持するのに十分である。

【0083】

そのような機能的断片は、それが由来する抗体の配列の

30

少なくとも5個のアミノ酸、好ましくは6、7、8、10、15、25、50または100個の連続アミノ酸を含む。

【0084】

好ましくは、これらの機能的断片の種類は、それらが得られた抗体と同じ結合特異性を通常有するFv、scFv、Fab、F(Ab')₂、F(Ab')、scFv-Fcまたは二重特異性抗体である。本発明によれば、本発明の抗体の断片は、ペプシンもしくはパパインを含む酵素消化等の方法によりおよび/または化学的還元によるジスルフィドブリッジの切断により、上記の抗体から得ることができる。抗体断片は更に、当業者に公知の組換え遺伝子技術によりまたは例えばアプライドバイオシステムズ社から販売されているような自動ペプチド合成装置を用いたペプチド合成等によっても得ることができる。

【0085】

より具体的には、本発明は、本明細書中でi) HZ515H7、Hz515H7またはhz515H7 Mabおよびii) HZ515H7-2、Hz515H7-2またはhz515H7-2 Mabと呼ばれるマウス515H7 Mabの種々のヒト化抗体バリエーションまたはiii) 前記抗体バリエーションの軽鎖および/または重鎖の任意の組合せに関する。

【0086】

更に分かりやすいように、本発明のヒト化バリエーション (型ともいう) hz515H7およびhz515H7-2のCDRに対応する種々のアミノ酸配列を以下の表2aに要約する。本発明のヒト化型hz515H7の種々のバリエーションの変換ドメインおよび全長配列に対応する種々のアミノ酸配列を表2bに要約する。本発明のヒト化型hz515H7-2の変換ドメインおよび全長配列に対応する種々のアミノ酸配列を表2cに要約する。

【0087】

【表2a】

表2a

抗体 Hz515H7	重鎖	軽鎖	配列番号
CDR	CDR-H1	-	4
	CDR-H2	-	5
	CDR-H3	-	6
	-	CDR-L1	7
	-	CDR-L2	8
	-	CDR-L3	9

【0088】

【表2b】

31

表 2b

抗体 H2S15H7	重鎖	軽鎖	配列番号
可変ドメイン	VH1	-	10
	VH1 D76N	-	11
	VH1 V48L D76N	-	12
	VH2	-	13
	-	VL1	14
	-	VL1 T59A E61D	15
	-	VL2	16
	-	VL2.1	17
	-	VL2.2	18
	-	VL2.3	19
完全配列 (シグナルペプチドなし)	-	VL3	20
	VH1	-	21
	VH1 D76N	-	22
	VH1 V48L D76N	-	23
	VH2	-	24
	-	VL1	25
	-	VL1 T59A E61D	26
	-	VL2	27
	-	VL2.1	28
	-	VL2.2	29
	-	VL2.3	30
	-	VL3	31

【0089】

【表 2c】

表 2c

抗体 H2S15H7-2	重鎖	軽鎖	配列番号
可変ドメイン	"コンセンサス"	-	85
	-	"コンセンサス"	86
	VH1	-	87
	-	VL1	88
完全配列 (シグナルペプチドなし)	"コンセンサス"	-	89
	-	"コンセンサス"	90
	VH1	-	91
	-	VL1	92

【0090】

不明瞭さを避けるための例として、「VH1」という表現は、「VHバリエント1」、「VH Var1」、「VH var 1」という表現とほぼ同じである。「コンセンサス」配列の入手は実施例22に記載されている。

【0091】

本発明の更に別の具体的態様は、ヒト抗体に由来する軽鎖および重鎖の定常領域がそれぞれラムダまたはカッパ領域およびガンマー1、ガンマー2またはガンマー4領域であることを特徴とするヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0092】

本発明は、2008年6月25日付でFrench collection for microorganism cultures (CNCM、パスツール研究所、フランス、パリ)に番号I-4019で寄託されたモノクローナル抗体を分泌するマウスハイブリドーマに関する。前記ハイブリドーマは、Balb/C免疫化マウス脾細胞とミエローマSp2/O-Ag14系の細胞との融合により得られた。

【0093】

ここで515H7で参照するマウスモノクローナル抗体は、2008年6月25日に番号I-4019でCNCMに寄託されたハイブリドーマによって分泌されるものである。

【0094】

32

本発明は更にキメラ抗体に関する。

【0095】

キメラ抗体は、特定の種の抗体に由来する天然の可変領域（軽鎖および重鎖）と前記特定の種と異種の種の抗体の軽鎖および重鎖の定常領域との組合せを含むものである。

【0096】

これらの抗体、またはそのキメラ断片は、遺伝子組換え技術を用いて作製することができる。例えば、キメラ抗体は、プロモーターと、本発明の非ヒトモノクローナル抗体の可変領域をコードする配列（特にマウス）と、ヒト抗体の定常領域をコードする配列とを含む組換えDNAをクローニングすることによって作製することができる。そのような組換え遺伝子の1つにコードされる本発明に係るキメラ抗体は、例えば、マウスーヒトキメラであり得、この抗体の特異性はマウスDNAに由来する可変領域によって決まり、アイソタイプはヒトDNAに由来する定常領域によって決まる。キメラ抗体の作製方法についてはVerhoeven et al. (BioEssays, 8:74, 1988)を参照されたい。

【0097】

別の実施形態では、本発明は、配列番号83から選択される配列の可変領域を含んでなるキメラ抗体重鎖（c515H7 VHと呼ぶ）に関する。

【0098】

別の実施形態では、本発明は、配列番号84の配列の可変領域を含んでなるキメラ抗体軽鎖（c515H7 VLと呼ぶ）に関する。

【0099】

好ましい特定の実施形態では、本発明のキメラ抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片は、配列番号83のアミノ酸配列を含んでなる重鎖配列および配列番号84のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖配列を含んでなる。

【0100】

本明細書において、「ヒト化抗体」とは、少なくとも1つの重鎖または1つの軽鎖を含んでなる抗体であって、前記重鎖または軽鎖が、非ヒト起源の抗体に由来するCDR領域を含み、抗体分子の残りの部分がヒト起源である（例えば、前記残りの部分は1種類（または複数種類）のヒト抗体に由来し得る）ものを指す。「ヒト化抗体」という表現により、本発明は、ヒト化鎖が1つだけで2つめがキメラまたはマウス鎖である抗体を含んでなる。好ましくは、本発明の「ヒト化抗体」は2つのヒト化鎖を含んでなり、すなわち重鎖および軽鎖の両方がヒト化されている。

【0101】

本発明のヒト化抗体またはその断片は、当業者に公知の技術によって作製することができる（例えば、文献Sing et al., J. Immun., 150:2844-2857, 1992; Mountai et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142,

33

1992およびBebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992に記載されている技術)。そのようなヒト化抗体は、インビトロでの診断またはインビボでの予防的および／もしくは治療的処置を含む方法におけるその使用に好ましい。当業者に知られるその他のヒト化技術、例えばPDL社によって欧州特許第0 451 216号、同第0 682 040号、同第0 939 127号、同第0 566 647号または米国特許第5, 530, 101号、同第6, 180, 370号、同第5, 585, 089号および同第5, 693, 761 10号に記載されている「CDRグラフト化」技術等。米国特許第5, 639, 641号または同第6, 054, 297号、同第5, 886, 152号および同第5, 877, 293号も挙げることができる。

【0102】

本発明は、上記のマウス抗体515H7から生じたヒト化抗体に関する。

【0103】

好ましい様式では、ヒト化抗体に由来する軽鎖および重鎖の定常領域は、それぞれ、ラムダまたはカッパおよび 20ガンマー1、ガンマー2またはガンマー4領域である。

【0104】

より具体的には、本発明は、i) ヒト抗体重鎖の対応するフレームワーク領域に相同なフレームワーク領域およびii) 異なる哺乳動物種に由来する抗体の対応するCDRに相同なCDRを含んでなるヒト化抗体重鎖に関し、前記CDRは、配列番号4、5および6の配列をそれぞれ含んでなるCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3からなる。

【0105】

言い換えると、本発明は、配列番号4、5および6の配列をそれぞれ含んでなるCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3からなるCDRを有するヒト化抗体重鎖に関する。当業者には、抗体515H7のヒト化に異なる生殖系列を選択できることは明らかであり、それにより、異なる型のヒト化515H7が得られる。より具体的には、好ましい非限定的実施形態では、j 遺伝子には同じ生殖系列を保存する一方でv遺伝子をコードする配列に異なる生殖系列を用いることができる。

【0106】

本発明では、使用できる生殖系列は以下の2つの補完的基準に基づいて選択される：

—各CDRのアミノ酸の長さはマウスCDRと生殖系列中の同等物との間で同一でなければならない；および
—アミノ酸中の生殖系列配列は元のマウス配列と少なくとも70%の同一性を有さなければならない。

【0107】

不明瞭さを避けるために、ここで本発明は同じ抗体515H7の2つの好ましい非限定的ヒト化型（バージョンともいう）を包含することに注意されたい。H z 5 1 5 50

34

H7ともいう最初の1つは、重鎖については生殖系列IGHV3-49*04（配列番号77）およびIGHJ4*01（配列番号81）、軽鎖については生殖系列IGKV4-1*01（配列番号78）およびIGKJ1*01（配列番号82）で得られたヒト化抗体からなる。H z 5 1 5 H7-2ともいう2つめは、重鎖については生殖系列IGHV3-73*01（配列番号79）およびIGHJ4*01（配列番号81）、軽鎖については生殖系列IGKV2D-40*01（配列番号80）およびIGKJ1*01（配列番号82）で得られたヒト化抗体からなる。

【0108】

別の実施形態では、本発明は配列番号10、11、12、13、85または87からなる群から選択される配列の可変領域を含んでなるヒト化抗体重鎖に関する。

【0109】

別の実施形態では、本発明は、配列番号10、11、12または13からなる群から選択される配列の可変領域を含んでなるヒト化抗体H515H7重鎖に関する。

【0110】

別の実施形態では、本発明は、配列番号85の配列の可変領域を含んでなるヒト化抗体H515H7-2重鎖に関する。

【0111】

別の実施形態では、本発明は、配列番号87の配列の可変領域を含んでなるヒト化抗体H515H7-2重鎖に関する。

【0112】

更に別の実施形態では、本発明は更に、H35S、V48L、R50F、A61D、D76NおよびA81Lからなる群から選択される1または複数のアミノ酸置換を含んでなる配列番号87の配列のヒト化抗体H515H7-2重鎖可変領域に関する。

【0113】

更に別の実施形態では、本発明は、配列番号21、22、23、24、89または91からなる群から選択される完全配列を含んでなるヒト化抗体重鎖に関する。

【0114】

更に別の実施形態では、本発明は、配列番号21、22、23または24からなる群から選択される完全配列を含んでなるヒト化抗体重鎖に関する。

【0115】

別の実施形態では、本発明は、配列番号89の完全配列を含んでなるヒト化抗体H515H7-2重鎖に関する。

【0116】

別の実施形態では、本発明は、配列番号91の完全配列を含んでなるヒト化抗体H515H7-2重鎖に関する。

【0117】

35

更に別の実施形態では、本発明は更に、H35S、V48L、R50F、A61D、D76NおよびA81Lからなる群から選択される1または複数のアミノ酸置換を含んでなる配列番号91の配列のヒト化抗体H515H7-2重鎖に関する。

【0118】

より具体的には、本発明は、i) ヒト抗体軽鎖の対応するフレームワーク領域に相同なフレームワーク領域およびii) 異なる哺乳動物種に由来する抗体の対応するCDRに相同なCDR、を含んでなるヒト化抗体軽鎖に関する、前記CDRは、配列番号7、8および9の配列をそれぞれ含んでなるCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3からなる。

【0119】

言い換えると、本発明は、配列番号7、8および9をそれぞれ含んでなるCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3からなるCDRを有するヒト化抗体軽鎖に関する。

【0120】

別の実施形態では、本発明は、配列番号14、15、16、17、18、19、20、86または88からなる群から選択される配列の可変領域を含んでなるヒト化抗体軽鎖に関する。

【0121】

別の実施形態では、本発明は、配列番号14、15、16、17、18、19または20からなる群から選択される配列の可変領域を含んでなるヒト化抗体H515H7軽鎖に関する。

【0122】

別の実施形態では、本発明は、配列番号86の配列の可変領域を含んでなるヒト化抗体H515H7-2重鎖に関する。

【0123】

別の実施形態では、本発明は、配列番号88の配列の可変領域を含んでなるヒト化抗体H515H7-2重鎖に関する。

【0124】

更に別の実施形態では、本発明は更に、L9S、I21M、D40A、L43Q、Y59A、A61D、D66A、S69T、G74E、D76Yおよび／またはV89Lからなる群から選択される1または複数のアミノ酸置換を含んでなる配列番号88の配列のヒト化抗体H515H7-2軽鎖可変領域に関する。

【0125】

更に別の実施形態では、本発明は、配列番号25、26、27、28、29、30、31、90または92からなる群から選択される完全配列を含んでなるヒト化抗体軽鎖に関する。

【0126】

別の実施形態では、本発明は、配列番号25、26、2

36

7、28、29、30または31からなる群から選択される完全配列を含んでなるヒト化抗体H515H7軽鎖に関する。

【0127】

別の実施形態では、本発明は、配列番号90の完全配列を含んでなるヒト化抗体H515H7-2軽鎖に関する。

【0128】

別の実施形態では、本発明は、配列番号92の完全配列を含んでなるヒト化抗体H515H7-2軽鎖に関する。

【0129】

更に別の実施形態では、本発明は更に、L9S、I21M、D40A、L43Q、Y59A、A61D、D66A、S69T、G74E、D76Yおよび／またはV89Lからなる群から選択される1または複数のアミノ酸置換を含んでなる配列番号92の配列のヒト化抗体H515H7-2軽鎖に関する。

【0130】

より具体的には、本発明は、i) ヒト抗体の対応するフレームワーク領域に相同なフレームワーク領域およびii) 異なる哺乳動物種に由来する抗体の対応するCDRに相同なCDRを各々が有する重鎖および軽鎖を含んでなることを特徴とするヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関し、ここで、前記CDRは、配列番号4、5および6の配列をそれぞれ含んでなる重鎖のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3ならびに配列番号7、8および9の配列をそれぞれ含んでなる軽鎖のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3からなる。

【0131】

言い換えると、本発明は、配列番号4、5および6の配列をそれぞれ含んでなるCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3からなるCDRを有する重鎖および配列番号7、8および9の配列をそれぞれ含んでなるCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3からなるCDRを有する軽鎖を含んでなることを特徴とするヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0132】

別の実施形態では、本発明は、配列番号10、11、12、13、83、85または87からなる群から選択される配列の重鎖可変領域および配列番号14、15、16、17、18、19、20、84、86または88からなる群から選択される配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0133】

別の実施形態では、本発明は、配列番号10、11、12または13からなる群から選択される重鎖可変領域お

37

よび配列番号14、15、16、17、18、19または20からなる群から選択される配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H515H7に関する。

【0134】

別の実施形態では、本発明は、配列番号85の配列の重鎖可変領域および配列番号86の配列の軽可変領域を含んでなるヒト化抗体H515H7-2に関する。

【0135】

別の実施形態では、本発明は、配列番号87の配列の重鎖可変領域および配列番号88の配列の軽可変領域を含んでなるヒト化抗体H515H7-2に関する。

【0136】

別の実施形態では、本発明は、配列番号85の配列の重鎖可変領域および配列番号88の配列の軽可変領域を含んでなるヒト化抗体H515H7-2に関する。

【0137】

別の実施形態では、本発明は、配列番号87の配列の重鎖可変領域および配列番号86の配列の軽可変領域を含んでなるヒト化抗体H515H7-2に関する。

【0138】

更に別の実施形態では、本発明は更に、H35S、V48L、R50F、A61D、D76NおよびA81Lからなる群から選択される1または複数のアミノ酸置換を含んでなる配列番号87の配列の重鎖可変領域ならびにD40A、L43Q、Y59A、A61D、S69T、G74EおよびD76Yからなる群から選択される1または複数のアミノ酸置換を含んでなる配列番号88の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H515H7-2に関する。

【0139】

更に別の実施形態では、本発明は、キメラ軽鎖と組み合わされたヒト化重鎖を含んでなるヒト化抗体に関する。

【0140】

更に別の実施形態では、本発明は、ヒト化軽鎖と組み合わされたキメラ重鎖を含んでなるヒト化抗体に関する。

【0141】

より具体的には、本発明は、配列番号83の配列の重鎖可変領域および配列番号14、15、16、17、18、19、20、86または88からなる群から選択される配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0142】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号83の配列の重鎖可変領域および配列番号14の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体c515H7 VH/Hz515H7VL1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0143】

好ましい実施形態では、本発明は配列番号83の配列の重鎖可変領域および配列番号15の配列の軽鎖可変領域

38

を含んでなるヒト化抗体c515H7 VH/Hz515H7 VL1 T59A E61Dまたはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0144】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号83の配列の重鎖可変領域および配列番号16の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体c515H7 VH/Hz515H7VL2またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0145】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号83の配列の重鎖可変領域および配列番号17の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体c515H7 VH/Hz515H7VL2、1またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0146】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号83の配列の重鎖可変領域および配列番号18の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体c515H7 VH/Hz515H7VL2、2またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0147】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号83の配列の重鎖可変領域および配列番号19の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体c515H7 VH/Hz515H7VL2、3またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0148】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号83の配列の重鎖可変領域および配列番号20の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体c515H7 VH/Hz515H7VL3またはその誘導化合物または機能的断片に関する。

【0149】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号83の配列の重鎖可変領域および配列番号86の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0150】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号83の配列の重鎖可変領域および配列番号88の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体c515H7 VH/Hz515H7-2 VL1またはその由来化合物もしくは機能的断片に関する。

【0151】

別の実施形態では、本発明は、配列番号10、11、12、13、85または87からなる群から選択される配列の重鎖可変領域および配列番号84の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

39

【0152】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号10の配列の重鎖可変領域および配列番号84の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H_z515H7 VH1/c515H7 VLまたはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0153】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号11の配列の重鎖可変領域および配列番号84の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H_z515H7 VH1D76N/c515H7 VLまたはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0154】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号12の配列の重鎖可変領域および配列番号84の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H_z515H7 VH1 V48L D76N/c515H7 VLまたはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0155】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号13の配列の重鎖可変領域および配列番号84の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H_z515H7 VH2/c515H7 VLまたはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0156】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号85の配列の重鎖可変領域および配列番号84の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0157】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号87の配列の重鎖可変領域および配列番号84の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H_z515H7-2 VH1/c515H7 VLまたはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0158】

更に別の実施形態では、本発明は、配列番号21、22、23、24、89または91からなる群から選択される配列の重鎖および配列番号25、26、27、28、29、30、31、90または92からなる群から選択される配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0159】

別の実施形態では、本発明は、配列番号21、22、23または24からなる群から選択される配列の重鎖および配列番号25、26、27、28、29、30または31からなる群から選択される配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体H_z515H7に関する。

【0160】

別の実施形態では、本発明は、配列番号89の配列の重

40

鎖および配列番号90の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体H_z515H7-2に関する。

【0161】

別の実施形態では、本発明は、配列番号91の配列の重鎖および配列番号92の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体H_z515H7-2に関する。

【0162】

更に別の実施形態では、本発明は更に、H35S、V48L、R50F、A61D、D76NおよびA81Lからなる群から選択される1または複数のアミノ酸置換を含んでなる配列番号91の配列の重鎖ならびにD40A、L43Q、Y59A、A61D、S69T、G74EおよびD76Yからなる群から選択される1または複数のアミノ酸置換を含んでなる配列番号92の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体H_z515H7-2に関する。

【0163】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号11の配列の重鎖可変領域および配列番号16の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H_z515H7 VH1 D76N VL2、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0164】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号22の配列の重鎖および配列番号27の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体H_z515H7 VH1 D76N VL2、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0165】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号11の配列の重鎖可変領域および配列番号17の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H_z515H7 VH1 D76N VL2、1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0166】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号22の配列の重鎖および配列番号28の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体H_z515H7 VH1 D76N VL2、1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0167】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号11の配列の重鎖可変領域および配列番号18の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H_z515H7 VH1 D76N VL2、2、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0168】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号22の配列の重鎖および配列番号29の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体H_z515H7 VH1 D76N VL2、2、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

41

する。

【0169】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号11の配列の重鎖可変領域および配列番号19の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2、3、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0170】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号22の配列の重鎖および配列番号30の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2、3、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0171】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号12の配列の重鎖可変領域および配列番号14の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 1 V 4 8 L D 7 6 N V L 1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0172】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号23の配列の重鎖および配列番号25の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 1 V 4 8 L D 7 6 N V L 1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0173】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号12の配列の重鎖可変領域および配列番号15の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 1 V 4 8 L D 7 6 N V L 1 T 5 9 A E 6 1 D、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0174】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号23の配列の重鎖および配列番号26の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 1 V 4 8 L D 7 6 N V L 1 T 5 9 A E 6 1 D、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0175】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号10の配列の重鎖可変領域および配列番号14の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 1 V L 1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0176】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号21の配列の重鎖および配列番号25の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 1 V L 1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0177】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号10の配列

42

の重鎖可変領域および配列番号88の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 1 / H z 5 1 5 H 7 - 2 V L 1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0178】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号11の配列の重鎖可変領域および配列番号88の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N / H z 5 1 5 H 7 - 2 V L 1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0179】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号12の配列の重鎖可変領域および配列番号88の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 1 V 4 8 L D 7 6 N / H z 5 1 5 H 7 - 2 V L 1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0180】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号13の配列の重鎖可変領域および配列番号88の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 2 / H z 5 1 5 H 7 - 2 V L 1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0181】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号21の配列の重鎖および配列番号92の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 1 / H z 5 1 5 H 7 - 2 V L 1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0182】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号22の配列の重鎖および配列番号92の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N / H z 5 1 5 H 7 - 2 V L 1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0183】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号23の配列の重鎖および配列番号92の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 1 V 4 8 L D 7 6 N / H z 5 1 5 H 7 - 2 V L 1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0184】

別の好ましい実施形態では、本発明は、配列番号24の配列の重鎖および配列番号92の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 V H 2 / H z 5 1 5 H 7 - 2 V L 1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0185】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号87の配列の重鎖可変領域および配列番号14の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体H z 5 1 5 H 7 - 2 V H 1

43

／Hz 5 1 5 H 7 VL 1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0186】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号87の配列の重鎖可変領域および配列番号15の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体Hz 5 1 5 H 7-2 VH1／Hz 5 1 5 H 7 VL1 T 5 9 A E 6 1 D、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0187】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号87の配列の重鎖可変領域および配列番号16の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体Hz 5 1 5 H 7-2 VH1／Hz 5 1 5 H 7 VL2、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0188】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号87の配列の重鎖可変領域および配列番号17の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体Hz 5 1 5 H 7-2 VH1／Hz 5 1 5 H 7 VL2. 1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0189】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号87の配列の重鎖可変領域および配列番号18の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体Hz 5 1 5 H 7-2 VH1／Hz 5 1 5 H 7 VL2. 2、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0190】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号87の配列の重鎖可変領域および配列番号19の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体Hz 5 1 5 H 7-2 VH1／Hz 5 1 5 H 7 VL2. 3、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0191】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号87の配列の重鎖可変領域および配列番号20の配列の軽鎖可変領域を含んでなるヒト化抗体Hz 5 1 5 H 7-2 VH1／Hz 5 1 5 H 7 VL3、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0192】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号91の配列の重鎖および配列番号25の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体Hz 5 1 5 H 7-2 VH1／Hz 5 1 5 H 7 VL1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0193】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号91の配列の重鎖および配列番号26の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体Hz 5 1 5 H 7-2 VH1／Hz 5 1 5 H 7 VL1 T 5 9 A E 6 1 D、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

44

【0194】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号91の配列の重鎖および配列番号27の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体Hz 5 1 5 H 7-2 VH1／Hz 5 1 5 H 7 VL2、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0195】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号91の配列の重鎖および配列番号28の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体Hz 5 1 5 H 7-2 VH1／Hz 5 1 5 H 7 VL2. 1、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0196】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号91の配列の重鎖および配列番号29の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体Hz 5 1 5 H 7-2 VH1／Hz 5 1 5 H 7 VL2. 2、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0197】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号91の配列の重鎖および配列番号30の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体Hz 5 1 5 H 7-2 VH1／Hz 5 1 5 H 7 VL2. 3、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0198】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号91の配列の重鎖および配列番号31の配列の軽鎖を含んでなるヒト化抗体Hz 5 1 5 H 7-2 VH1／Hz 5 1 5 H 7 VL3、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0199】

上記で例示したVH／VLの組合せは限定するものではないと理解されなければならない。当業者であれば、当然、過度な負担なしに且つ発明的能力を用いることなく、本明細書に開示されている全てのVHおよびVLを再編成することができる。したがって、当業者であれば、本願に開示されている全てのVHおよびVLの全組合せに対応する全てのヒト化抗体を得ることができる。

【0200】

本発明の新規な態様は、以下の核酸（全ての縮重遺伝暗号を含む）から選択されることを特徴とする単離された核酸に関する：

a) 本発明に係るヒト化抗体重鎖をコードするまたはその誘導化合物もしくは機能的断片をコードする核酸、DNAまたはRNA；

b) 本発明に係るヒト化抗体軽鎖をコードするまたはその誘導化合物もしくは機能的断片をコードする核酸、DNAまたはRNA；

c) 本発明に係るヒト化抗体をコードするまたはその誘導化合物もしくは機能的断片をコードする核酸、DNA

45

またはRNA；

d) a)、b) または c) に記載の核酸に相補的な核酸；

e) 配列番号38～41、49～52、93または95の核酸配列を含んでなる少なくとも1つの重鎖と、好ましくはIMGTまたはKabatのCDRのナンバリングによるその3つのCDRの少なくとも1つと、高ストリンジентな条件下でハイブリダイズしうる少なくとも18ヌクレオチドの核酸；

f) 配列番号42～48、53～59、94または96の核酸配列を含んでなる少なくとも1つの軽鎖と、好ましくはIMGTまたはKabatのCDRのナンバリングによるその3つのCDRの少なくとも1つと、高ストリンジентな条件下でハイブリダイズしうる少なくとも18ヌクレオチドの核酸。

【0201】

本発明は更に、ヒト化抗体の重鎖可変領域をコードする核酸配列を含んでなる単離された核酸分子であって、前記重鎖可変領域ヌクレオチド配列が、配列番号32のCDR-H1ヌクレオチド配列；配列番号33のCDR-H2ヌクレオチド配列；および配列番号34のCDR-H3ヌクレオチド配列を含んでなる、核酸分子に関する。

【0202】

本発明は更に、ヒト化抗体の軽鎖可変領域をコードする核酸配列を含んでなる単離された核酸分子であって、前記軽鎖可変領域ヌクレオチド配列が、配列番号35または60のCDR-L1ヌクレオチド配列；配列番号36または61のCDR-L2ヌクレオチド配列；および配列番号37または62のCDR-L3ヌクレオチド配列を含んでなる、核酸分子に関する。

【0203】

本発明は更に、ヒト化抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードする核酸配列を含んでなる単離された核酸分子であって、

前記重鎖可変領域ヌクレオチド配列が、配列番号32のCDR-H1ヌクレオチド配列；配列番号33のCDR-H2ヌクレオチド配列；および配列番号34のCDR-H3ヌクレオチド配列を含んでなり；

前記軽鎖可変領域ヌクレオチド配列が、配列番号35または60のCDR-L1ヌクレオチド配列；配列番号36または61のCDR-L2ヌクレオチド配列；および配列番号37または62のCDR-L3ヌクレオチド配列を含んでなる、核酸分子に関する。

【0204】

本発明の抗体H_z515H7のCDRに対応する最適化されたヌクレオチド配列を以下の表3aに要約する。本発明のヒト化抗体H_z515H7の種々のバリエーションの可変ドメインおよび全長配列に対応する種々の最適化さ

46

れたヌクレオチド配列を表3bに要約する。本発明のヒト化バージョンh_z515H7-2の可変ドメインおよび全長配列に対応する種々の最適化されたヌクレオチド配列を表3cに要約する。

【0205】

【表3a】

表3a

抗体 H _z 515H7	重鎖	軽鎖	配列番号
最適化された CDR	CDR-H1	-	32
	CDR-H2	-	33
	CDR-H3	-	34
	-	CDR-L1	35
	-	CDR-L1 (bis)	60
	-	CDR-L2	36
	-	CDR-L2 (bis)	61
	-	CDR-L3	37
	-	CDR-L3 (bis)	62
	-	-	-

【0206】

【表3b】

表3b

H _z 515H7	重鎖	軽鎖	配列番号
可変ドメイン	VH1	-	38
	VH1 D76N	-	39
	VH1 V48L D76N	-	40
	VH2	-	41
	-	VL1	42
	-	VL1 T59A E61D	43
	-	VL2	44
完全配列 (シグナルペプチドなし)	-	VL2.1	45
	-	VL2.2	46
	-	VL2.3	47
	-	VL3	48
	VH1	-	49
	VH1 D76N	-	50
	VH1 V48L D76N	-	51
	VH2	-	52
	-	VL1	53
	-	VL1 T59A E61D	54
	-	VL2	55
	-	VL2.1	56
	-	VL2.2	57
	-	VL2.3	58
	-	VL3	59

【0207】

【表3c】

表3c

抗体 H _z 515H7-2	重鎖	軽鎖	配列番号
可変ドメイン	VH1	-	93
	-	VL1	94
完全配列 (シグナルペプチドなし)	VH1	-	95
	-	VL1	96

【0208】

「最適化された配列」という表現は、興味のあるタンパク質（本明細書では抗体の可変ドメイン）の構成的アミノ酸をコードするコドンが、専用の細胞型（本明細書では哺乳動物細胞）における翻訳機構によってよりよく認識されるように最適化されていることを意味する。この点に関し、最適化された配列によってコードされる所定のタンパク質のアミノ酸配列は最適化されていない配列によってコードされるものと同じであるが、ヌクレオチド配列は異なる。最適化には、G/C含量の適合および安定なRNA二次構造の防止も含まれる（例としては、Kim et al., 1997 Gene 199(1-2):293-301を参照された

い)。

【0209】

例えば、マウスCDR-H1のヌクレオチド配列(配列番号71)が最適化され、ヒト化CDR-H1のヌクレオチド配列(配列番号32)に対応し、コドンggg、actおよびgat(それぞれ残基Gly、ThrおよびAspをコードする)がそれぞれggc、accおよびgac(やはりそれぞれ残基Gly、ThrおよびAspをコードする)で置換されている。

【0210】

CDR-H2およびCDR-H3(それぞれ配列番号72および73)に関して、これらも最適化され、それぞれ配列番号33および34の最適化されたCDRに対応する。

【0211】

軽鎖の3つのCDR(それぞれ配列番号74、75および76)についても同様であり、VL1、VL2およびVL3(それぞれ配列番号35、36および37)ならびにVL2.1、VL2.2およびVL2.3(それぞれ配列番号60、61および62)に対応する2つの最適化されたヒト化型がある。

【0212】

元のCDR、すなわちマウスの最適化されていない配列を以下の表4に要約する。

【0213】

【表4】

表4

抗体 515H7	重鎖	軽鎖	配列番号
マウス CDR	CDR-H1	-	71
	CDR-H2	-	72
	CDR-H3	-	73
	-	CDR-L1	74
	-	CDR-L2	75
	-	CDR-L3	76

【0214】

本明細書中で同義で使用されている、「核酸」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」および「ヌクレオチド配列」という用語は修飾されていてもよく、核酸の断片または領域を定義し、非天然ヌクレオチドを含んでもよく、二本鎖DNA、一本鎖DNA、または前記DNAの転写産物のいずれかであるヌクレオチドの正確な配列を意味する。

【0215】

本発明は天然の染色体環境中すなわち天然状態のヌクレオチド配列に関するものではないことをここで記載しておく。本発明の配列は、単離および/または精製されたものであり、すなわち、これらは、例えばコピーによって、直接または間接的にサンプリングされ、その環境が少なくとも部分的に変更されたものである。例えば宿主細胞を用いた組換え遺伝子技術によって得られたまたは化学合成によって得られた単離された核酸もここで述べ

ておく。

【0216】

好ましい配列と最適なアラインメント後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性パーセンテージを示す核酸配列」とは、参照核酸配列に関して、特定の修飾、例えば特に欠失、切断、伸張、キメラ融合、および/または置換(特に点での)を示す核酸配列を意味する。好ましくは、これらは、参照配列と同じアミノ酸配列をコードする配列であり、これは、遺伝暗号の縮重、あるいは、好ましくは高ストリンジентな条件化で、特に以下に記載する条件化で、参照配列と特異的にハイブリダイズすると思われる相補的配列に関連する。

【0217】

高ストリンジентな条件化でのハイブリダイゼーションとは、2つの相補的DNA断片間でハイブリダイゼーションが維持されるように温度およびイオン強度に関連する条件が選択されることを意味する。純粋な例として、上記のポリヌクレオチド断片を定義するためのハイブリダイゼーション工程の高ストリンジентな条件は好ましくは以下の通りである。

【0218】

DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションは2工程で行われる：(1) 5×SSC(1×SSCは0.15M NaCl+0.015M クエン酸ナトリウムの溶液に相当)、50%ホルムアミド、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、10×デンハルト液、5%硫酸デキストランおよび1%サケ精子DNAを含むリン酸バッファー(20mM、pH7.5)中、42℃で3時間のプレハイブリダイゼーション；(2) プローブの長さに応じた温度(すなわち、長さが100ヌクレオチドを超えるプローブでは42℃)で20時間の一次ハイブリダイゼーション、続いて、2×SSC+2%SDS中、20℃で20分間のウォッシュを2回、0.1×SSC+0.1%SDS中、20℃で20分間のウォッシュを1回。最後のウォッシュを、長さが100ヌクレオチドを超えるプローブでは60℃で30分間、0.1×SSC+0.1%SDS中で行う。当業者は、既定のサイズのポリヌクレオチドについての上記の高度にストリンジентなハイブリダイゼーション条件を、Sambrook, et al. (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3rd edition, 2001)に記載されている手順に従って、より長いまたはより短いオリゴヌクレオチドに適合させることができる。

【0219】

本発明は更に、本発明に記載の核酸を含んでなるベクターに関する。

【0220】

本発明は、特に、そのようなヌクレオチド配列を含むク

49

ローニングベクターおよび／または発現ベクターに関する。

【0221】

本発明のベクターは、好ましくは、所定の宿主細胞中のヌクレオチド配列の発現および／または分泌を可能にするエレメントを含む。したがって、ベクターは、プロモーター、翻訳開始シグナルおよび翻訳終結シグナルならびに好適な転写制御領域を含まなければならない。これは、宿主細胞中に安定に維持することができなければならない。翻訳されたタンパク質の分泌を指定する特別なシグナルを有してもよい。これらの種々のエレメントは、使用される宿主細胞に応じて当業者によって選択および最適化される。そのために、ヌクレオチド配列は、選択された宿主内の自己複製ベクター中に挿入してもよく、選択された宿主の組込みベクターであってもよい。

【0222】

そのようなベクターは、当業者により通常用いられる方法によって調製され、得られたクローンは、リポフェクション、エレクトロポレーション、ヒートショックまたは化学的方法等の標準的方法によって好適な宿主中に導入することができる。

【0223】

ベクターは、例えばプラスミドまたはウイルス起源のベクターである。これらは、本発明のヌクレオチド配列をクローニングまたは発現するために宿主細胞の形質転換に使用される。

【0224】

本発明は更に、本発明に記載のベクターで形質転換されたまたはこれを含んでなる宿主細胞を含んでなる。

【0225】

宿主細胞は、原核または真核系、例えば細菌細胞、更に例えば酵母細胞または動物細胞、特に哺乳動物細胞から選択することができる。昆虫または植物細胞を用いることもできる。

【0226】

本発明は更に、本発明に係る形質転換細胞を有するヒト以外の動物に関する。

【0227】

本発明の別の態様は、以下の工程を含んでなることを特徴とする、本発明に係る抗体、またはその機能的断片の1つ、を産生する方法に関する：

a) 本発明に係る宿主細胞の培地および宿主細胞に適した培養条件で培養する工程；および

b) このようにして産生された前記抗体、またはその機能的断片の1つ、を培養培地または前記培養細胞から回収する工程。

【0228】

本発明に係る形質転換細胞は、本発明に係る組換えポリペプチドの製造方法に有用である。本発明は更に、ベクターおよび／または本発明に係るベクターによって形質

50

転換された細胞を使用することを特徴とする、組換え型の本発明に係るポリペプチドの製造方法を含んでなる。好ましくは、本発明に係るベクターで形質転換された細胞は、上記ポリペプチドの発現および前記組換えペプチドの回収を可能にする条件下で培養される。

【0229】

既に述べたように、宿主細胞は原核または真核系から選択することができる。特に、そのような原核または真核系における分泌を促進する本発明のヌクレオチド配列を同定することが可能である。したがって、そのような配列を有する本発明に係るベクターを、分泌される組換えタンパク質の産生に有利に使用することができる。実際、これらの目的の組換えタンパク質の精製は、これらが宿主細胞中よりも細胞培養の上清中に存在することで容易になる。

【0230】

本発明のポリペプチドは化学合成によって製造することもできる。そのような製造方法の1つも本発明の対象である。化学合成法、例えば固相技術（特にSteward et al, 1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, Ill, 2nd ed. 参照）または部分的固相（partial solid-phase）技術、断片の縮合によるまたは従来の溶液中での合成による化学合成法は当業者に公知である。本発明は更に、化学合成によって得られ且つ対応する非天然アミノ酸を含むことができるポリペプチドを含んでなる。

【0231】

本発明は更に、本発明の方法によって得られると思われる抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的断片を含んでなる。

【0232】

更に別の態様によれば、本発明は、更にヒトケモカインファミリー受容体に特異的に結合でき且つ／またはそのような受容体のシグナル伝達を特異的に阻害できることを特徴とする前述の抗体に関する。

【0233】

新規な実施形態によれば、本発明は、例えばVEGFR、VEGF、EGFR、IGF-1R、HER2neu、HGF、cMET、FGF、テラスパニン、インテグリン、CXCR4（本発明の抗体以外、すなわち別のエピトープを標的とする）、CXCR7またはCXCR2等の腫瘍の発症に関与する受容体と相互作用できる第2のモチーフを含んでなるという意味で二重特異性である抗体からなる抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0234】

二重特異性または二機能性抗体は、同じ分子中に2つの異なる可変領域が組み合わされた第2世代のモノクローナル抗体である（Hollinger and Bohlen, 1999, Cancer and metastasis, rev. 18:411-419）。新たなエフェク

51

ター機能をリクルートする能力または腫瘍細胞表面上の複数の分子を標的とする能力に関して、診断領域および治療領域の両方においてその有用性が実証されている。そのような抗体は、化学的方法 (Glennie MJ et al, 1987, J. Immunol. 139, 2367-2375; Repp R. et al, 1995, J. Hemat., 377-382) または体細胞法 (somatic method) (Staerz U.D. and Bevan M.J., 1986, PNAS83, 1453-1457; Suresh M.R. et al, 1986, Method Enzymol., 121 :210-228) によって得ることができ、更に、好ましくは、ヘテロ二量体化させることにより求める抗体の精製を容易にすることが可能な遺伝子操作技術によっても得ることができる (Merchand et al, 1998, Nature Biotech., 16:677-681)。

【0235】

これらの二重特異性抗体は、完全 (whole) IgG、二重特異性 Fab' 2、Fab' PEG、二重特異性抗体 (diabody) または二重特異性 scFv として、更には標的とする各抗原について2つの結合部位が存在する四価の二重特異性抗体 (Park et al, 2000, Mol. Immunol., 37(18): 1123-30) または前述したその断片として構築してもよい。

【0236】

二重特異性抗体の製造および投与が2つの特異的抗体の産生より安価である場合の経済的利点に加えて、このような二重特異性抗体の使用には、治療の毒性を低減するという利点がある。実際、二重特異性抗体の使用により、循環抗体の全量を減らすことができ、したがって起こり得る毒性を低減することができる。

【0237】

本発明の好ましい実施形態では、二重特異性抗体は2価または4価の抗体である。

【0238】

最後に、本発明は、薬物として使用するための上記の抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片に関する。

【0239】

本発明は更に、本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的断片の1つ、からなる化合物を活性成分として含んでなる医薬組成物に関する。好ましくは、前記抗体に補形剤および／または薬学的に許容されるキャリアが添加される。

【0240】

本発明は更に、CXCR4に対する抗体以外の抗腫瘍抗体を同時、別個、または拡張使用 (extended use) のための組合せ物として更に含んでなることを特徴とする組成物に関する。

【0241】

更に別の実施形態では、本発明は更に、IGF-IR、EGFR、HER2/neu、cMET、VEGFRもしくはVEGF等の受容体のチロシンキナーゼ活性を特異的に阻害できる化合物または当業者に公知の任意の他

52

の抗腫瘍化合物から選択される少なくとも1つの第2の抗腫瘍化合物を含んでなる上記の医薬組成物に関する。

【0242】

本発明の第2の好ましい態様によれば、前記第2の化合物は、前記受容体によって促進される増殖および／または抗アポトーシスおよび／または血管形成および／または播種性転移 (metastatic dissemination) 誘導活性を阻害できる単離された抗体である抗EGFR、抗IGF-IR、抗HER2/neu、抗cMET、VEGFR、VEGF等またはその機能的断片および誘導化合物から選択することができる。

【0243】

リツキシマブ、イブリツモマブまたはトシツモマブ等の抗CD20抗体；ゲムツズマブまたはリンツズマブ等の抗CD33抗体；エピラツズマブ等の抗CD22抗体；アレムツズマブ等の抗CD52抗体；エドレコロマブ、Ch 17-1AまたはIGN-101等の抗EpCAM抗体；ザクチン (Xactin) 等の抗CTP21または16抗体；¹³¹I-Cotara TNT-1等の抗DNA-Ag抗体；ペムツモマブまたはR1150等の抗MUC1抗体；ABX-MA1等の抗MUC18抗体；ミツモマブ等の抗GD3抗体；CeaVacまたはラベツズマブ等の抗ECA抗体；OvaRex等の抗CA125抗体；アポリズマブ等の抗HLA-DR抗体；MDX-010等の抗CTLA4抗体；MDX-070、¹¹¹In⁹⁰Y-J591、¹⁷⁷Lu J591、J591-DM1等の抗PSMA抗体；IGN311等の抗ルイスY抗体；AS1405、90YmuB C1等の抗血管形成抗体；TRAIL R1mAbまたはTRAIL R2mAb等の抗Trail-R1抗体を好適なものとして挙げられる。

【0244】

本発明の補足的な別の実施形態は、同時、別個、または拡張使用のための組合せ物または併用剤として細胞毒性薬剤／細胞分裂阻害剤を更に含んでなる上記組成物からなる。

【0245】

「同時使用」とは、組成物の両化合物を単一の製剤に含めて投与することを意味する。

【0246】

「別個使用」とは、組成物の両化合物を異なる製剤に含めて同時に投与することを意味する。

【0247】

「拡張使用」とは、組成物の両化合物を異なる製剤にそれぞれ含めて逐次投与することを意味する。

【0248】

一般的に、本発明に係る組成物は、がんの治療の有効性をかなり上昇させる。言い換えると、細胞毒性薬剤の投与により、本発明の抗体の治療効果は予想されるよりも大きく増大する。したがって、本発明の組成物によって

53

得られるもう1つの大きな利点は、使用する活性成分の有効量がより少なくなる可能性、したがって、副作用、特に細胞毒性薬剤の影響が現れるリスクを回避または低減することが可能になる可能性に関する。更に、この組成物は、予想される治療効果をより迅速に達成することを可能にする。

【0249】

「治療的抗がん剤」または「細胞毒性薬剤」とは、患者に投与された時に患者におけるがんの発症が治療または予防される物質を意味する。そのような薬剤の非限定的な例としては、「アルキル化」剤、代謝拮抗剤、抗腫瘍抗生物質、有糸分裂阻害剤、クロマチン機能阻害剤、抗血管形成剤、抗エストロゲン薬、抗アンドロゲン薬および免疫調節剤が含まれる。

【0250】

そのような薬剤は、例えばVIDALの「Cytotoxic」の見出しの下で腫瘍学および血液学に関連する化合物に費やされたページに挙げられており、この文献に参照により引用されている細胞毒性化合物を好ましい細胞毒性薬剤として本明細書に引用する。

【0251】

「アルキル化剤」とは、細胞中の任意の分子、好ましくは核酸（例えばDNA）、に共有結合できるまたはこれをアルキル化できる任意の物質を指す。そのようなアルキル化剤の例としては、メクロレタミン、クロラムブシル、メルファラン、クロルハイドレート、ビボブロマン、プレドニムスチン、リン酸二ナトリウムまたはエストラムスチン等のナイトロジェンマスタード；シクロホスファミド、アルトレタミン、トロホスファミド、スルホスファミドまたはイホスファミド等のオキサザホスホリン；チオテパ、トリエチレンアミンまたはアルテトラミン（altetramine）等のアジリジンまたはエチレンーイミン；カルムスチン、ストレプトゾシン、ホテムスチンまたはロムスチン等のニトロソウレア；ブスルファン、トレオスルファンまたはインプロスルファン等のアルキルスルホナート；ダカルバジン等のトリアゼン；またはシスプラチン、オキサリプラチンもしくはカルボプラチン等の白金錯体が含まれる。

【0252】

「代謝拮抗剤」とは、特定の活性、一般にDNA合成、を妨げることにより成長および／または細胞代謝をブロックする物質を指す。代謝拮抗剤の例としては、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、フロクスウリジン、5-フルオロデオキシウリジン、カペシタビン、シタラビン、フルダラビン、シトシンアラビノシド、6-メルカプトプリン（6-MP）、6-チオグアニン（6-TG）、クロロデオキシシアデノシン、5-アザシチジン、ゲムシタビン、クラドリビン、デオキシコホルマイシンおよびペントスタチンが含まれる。

【0253】

54

「抗腫瘍抗生物質」とは、DNA、RNAおよび／またはタンパク質の合成を防止または阻害できる化合物を意味する。そのような抗腫瘍抗生物質の例としては、ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、バルビシン、ミトキサントロン、ダクチノマイシン、ミトラマイシン、プリカマイシン、マイトマイシンC、ブレオマイシンおよびプロカルバジンが含まれる。

【0254】

「有糸分裂阻害剤」は、細胞周期および有糸分裂の正常な進行を防止する。一般的に、微小管阻害剤または「タキソイド」、例えばパクリタキセルおよびドセタキセルが有糸分裂を阻害することができる。ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシンおよびビノレルビン等のビンカルカロイドも有糸分裂を阻害することができる。

【0255】

「クロマチン阻害剤」または「トポイソメラーゼ阻害剤」は、トポイソメラーゼIおよびII等のクロマチンを形作るタンパク質の正常な機能を阻害する物質である。そのような阻害剤の例としては、トポイソメラーゼIには、カンプトテシンおよびその誘導体、例えばイリノテカンまたはトポテカン；トポイソメラーゼIIには、エトポシド、リン酸エチポシドおよびテニポシドが含まれる。

【0256】

「抗血管形成剤」とは、血管の成長を阻害する任意の薬物、化合物、物質または薬剤である。抗血管形成剤の例としては、限定されるものではないが、ラゾキシシン、マリマスタット、パチマスタット、プリノマスタット、タノマスタット、イロマスタット、CGS-27023A、ハロフジノン、COL-3、ネオバスタット、BMS-275291、サリドマイド、CDC 501、DMXAA、L-651582、スクアラミン、エンドスタチン、SU5416、SU6668、インターフェロン-α、EMD121974、インターロイキン-12、IM862、アンジオスタチンおよびビタキシシン（vitaxin）が含まれる。

【0257】

「抗エストロゲン薬」または「エストロゲンアンタゴニスト」とは、エストロゲンの作用を低減、拮抗または阻害する任意の物質を指す。そのような薬剤の例としてはタモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、イオドキシフェン、アナストロゾール、レトロゾールおよびエキセメスタンが挙げられる。

【0258】

「抗アンドロゲン薬」または「アンドロゲンアンタゴニスト」とは、アンドロゲンの作用を低減、拮抗または阻害する任意の物質を指す。抗アンドロゲン薬の例としては、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、スプリロノラクトン、酢酸シプロテロン、フィナステリドおよびシミチジンが含まれる。

50

55

【0259】

免疫調節剤とは免疫系を刺激する物質である。免疫調節剤の例としては、インターフェロン、インターロイキン、例えばアルデスロイキン、OCT-43、デニロイキンジフチトクスまたはインターロイキン-2、腫瘍壊死因子、例えばタソネルミン、または他の種類の免疫調節剤、例えばレンチナン、シゾフィラン、ロキニメックス、ピドチモド、ペガデマーズ、チモペンチン、ポリI：Cまたはレバミソールと5-フルオロウラシルの組合せが含まれる。

【0260】

更なる詳細について、当業者は、French Association of Therapeutic Chemistry Teachersによって刊行された「Therapeutic chemistry, vol. 6, Antitumor drugs and perspectives in the treatment of cancer, TEC and DOC edition, 2003 [フランス語]」というタイトルのマニュアルを参照することができる。

【0261】

特に好ましい実施形態では、組合せ物としての本発明の前記組成物は、同時使用のために前記細胞毒性薬剤が前記抗体に化学的に結合していることを特徴とする。

【0262】

特に好ましい実施形態では、前記組成物は、前記細胞毒性薬剤/細胞分裂阻害剤が、紡錘体阻害剤または安定化剤、好ましくはビノレルビンおよび/またはビンフルニンおよび/またはビンクリスチンから選択されることを特徴とする。

【0263】

前記細胞毒性薬剤と本発明に係る抗体との間の結合を容易にするために、結合させる2つの化合物の間にポリ(アルキレン)グリコールのポリエチレングリコールまたはアミノ酸等のスペーサー分子を導入してもよく、あるいは、別の実施形態では、前記抗体と反応できる機能が導入された前記細胞毒性薬剤の活性誘導体を用いてもよい。これらの結合技術は当業者に周知であり、本明細書中で更に詳細な説明はしない。

【0264】

その他のEGFR阻害剤としては、限定されるものではないが、モノクローナル抗体C225および抗EGFR 22Mab (インクローンシステムズ社 (ImClone Systems Incorporated))、ABX-EGF (アブジェニックス社 (Abgenix)) /セルジェネシス社 (Cell Genesys))、EMD-7200 (メルク KgaA社 (Merck KgaA)) または化合物ZD-1834、ZD-1838およびZD-1839 (アストラゼネカ社)、PKI-166 (ノバルティス社)、PKI-166/C GP-75166 (ノバルティス社)、PTK787 (ノバルティス社)、CP701 (セファロン社 (Cephalon))、フルノミド (flunomide) (

56

ファルマシア社/スゲン社 (Sugen)、CI-1033 (ワーナーランバート・パークデービス社 (Warner Lambert Parke Davis))、CI-1033/PD 183, 805 (ワーナーランバート・パークデービス社)、CL-387, 785 (ワイエス・アイエルスト社 (Wyeth-Ayerst))、BBR-1611 (ベーリンガーマンハイムGMBH社/ロシュ社)、ナアミジンA (ブリistolボード・マイヤーズスクイブ社 (Bristol-board Myers Squibb))、RC-3940-I I (ファルマシア社)、BIBX-1382 (ベーリンガーインゲルハイム社)、OLX-103 (メルク・アンド・カンパニー)、VRCTC-310 (ベンテック・リサーチ社 (Venteck Research))、EGF融合毒素 (セラゲン社 (Seragen Inc.))、DAB-389 (セラゲン社/リルガンド社 (Lilgand))、ZM-252808 (王立癌研究所 (Imperial Cancer Research Fund))、RG-50864 (INSERM)、LFM-A12 (パーカーヒューズセンターがん (Parker Hughes Center Cancer))、WHI-P97 (パーカーヒューズセンターがん)、GW-282974 (グラクソ社)、KT-8391 (協和発酵) または「EGFRワクチン」(ヨークメディカル社/免疫分子センター (Centro of Immunologia Molecular)) が含まれる。

【0265】

本発明の別の態様は、前記抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的断片、の少なくとも1つが細胞毒素および/またはラジオアイソトープと組み合わされているまたはコンジュゲートしていることを特徴とする組成物に関する。

【0266】

好ましくは、前記毒素または前記ラジオアイソトープは腫瘍細胞の成長または増殖を防止することができ、特に前記腫瘍細胞を完全に不活化することができる。

【0267】

更に、好ましくは、前記毒素は、腸内細菌毒素、特にシェードモナス外毒素Aである。

【0268】

治療抗体と組み合わせるのに好ましいラジオアイソトープは、ガンマ線を発するラジオアイソトープ、好ましくはヨウ素¹³¹、イットリウム⁹⁰、金¹⁹⁹、パラジウム¹⁰⁰、銅⁶⁷、ビスマス²¹⁷ およびアンチモン²¹¹ である。アルファ線およびベータ線を発するラジオアイソトープも治療に用いることができる。

【0269】

「本発明の少なくとも1つの抗体またはその機能的断片と組み合わされた毒素またはラジオアイソトープ」とは

57

、特に2つの化合物間の共有結合により、前記毒素または前記ラジオアイソトープをその少なくとも1つの抗体に結合させることを可能にする任意の手段を指し、結合分子が導入されてもよく、されなくてもよい。

【0270】

コンジュゲートの要素の全部または一部の化学的（共有）結合、静電結合、または非共有結合を可能にする薬剤の例としては、特に、ベンゾキノ、カルボジイミド、より具体的にはEDC（1-エチル-3-[3-ジメチルルーアミノプロピル]-カルボジイミド-ヒドロクロリド）、ジマレイミド、ジチオビス-ニトロ安息香酸（DTNB）、N-スクシンイミジルS-アセチルチオアセタート（SATA）、紫外（UV）線と反応する1または複数の基を有する、1または複数のフェニルアシド基を有する架橋剤、最も好ましくはN-[4（アジドサリチルアミノ）ブチル]-3'-（2'-ピリジルジチオ）-プロピオンアミド（APDP）、N-スクシンイミド-イル3（2'-ピリジルジチオ）プロピオナート（SPDP）および6-ヒドラジノ-ニコチンアミド（HYNIC）が含まれる。

【0271】

もう1つの結合形態は、特にラジオアイソトープの場合、二官能性イオンキレート化剤の使用からなり得る。

【0272】

そのようなキレーターの例としては、免疫グロブリンと金属、特に放射性金属を結合させるために開発されたEDTA（エチレンジアミン四酢酸）またはDTPA（ジエチレントリアミン五酢酸）に由来するキレーターが含まれる。したがって、DTPAおよびその誘導体は、リガンド-金属錯体の安定性および剛性（rigidity）を増大させるように種々の基によって炭素鎖上で置換され得る（Krejcarek et al, 1977; Brechbiel et al, 1991; Gansow, 1991; 米国特許第4, 831, 175号）。

【0273】

例えば、DTPA（ジエチレントリアミン五酢酸）およびその誘導体は、遊離形態または金蔵イオンとの錯体形態で薬物および生物学において長い間広く使用されており、がん治療のためのラジオアイソトープコンジュゲートを開発するための抗体等の治療または診断目的のタンパク質とカップリングし得る金属イオンと安定なキレートを形成する注目すべき特徴を示す（Meases et al, 1984; Gansow et al, 1990）。

【0274】

また好ましくは、前記コンジュゲートを形成する本発明の前記少なくとも1つの抗体は、その機能的断片、特に構成要素Fcを失った断片、例えばscFv断片から選択される。

【0275】

本発明は更に、がんの予防または治療を目的とする薬物

58

を製造するための組成物の使用を含んでなる。

【0276】

本発明は更に、腫瘍細胞の成長を阻害する薬物を製造するための、本発明に係る、好ましくはヒト化された、抗体もしくはその誘導化合物もしくは機能的断片および／または組成物の使用に関する。広義には、本発明は、がんを予防または治療する薬物を製造するための、好ましくはヒト化された、抗体もしくはその誘導化合物もしくは機能的断片および／または組成物の使用に関する。

【0277】

予防および／または治療され得る好ましいがんには、前立腺癌、骨肉腫、肺癌、乳癌、子宮内膜癌、結腸癌、多発性骨髄腫、卵巣癌、膵臓癌または任意のその他のがんが含まれる。

【0278】

本発明は更に、細胞中のCXCR4活性を調節するための薬物を製造するための、前述した抗体もしくはその誘導化合物もしくは機能的断片および／または組成物の使用に関する。

【0279】

本発明の別の態様は、CXCR4発現レベルに関連する疾患の、好ましくはインビトロでの、診断方法における上記抗体の使用に関する。好ましくは、前記診断方法における前記CXCR4タンパク質関連疾患はがんである。

【0280】

したがって、本発明の抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片は、生体サンプル中のCXCR4タンパク質をインビトロで検出および／または定量化する方法、特に、がんのようなこのタンパク質の異常発現に関連する疾患の診断方法において使用でき、前記方法は以下の工程を含んでなる：

- 生体サンプルを本発明に係る抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片に接触させる工程；
- 形成されるであろう抗原-抗体複合体を示す工程。

【0281】

したがって、本発明は更に、以下の構成要素を含んでなる、上記方法を実施するためのキットまたは付属物を含んでなる：

- 本発明のポリクローナルまたはモノクローナル抗体；
- 必要に応じて、免疫学的反応に好ましい培地（medium）を構成するための試薬；
- 必要に応じて、免疫学的反応によって生成する抗原-抗体複合体を明らかにする試薬。

【0282】

一般的に、本発明は、CXCR4の発現に関連する発がん性障害をインビトロで診断するためまたはCXCR4の発現に関連する発がん性障害の発症についての予後をインビトロで決定するための、それぞれ配列番号4、5

59

および6の配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3の3つのCDRを含んでなる重鎖ならびにそれぞれ配列番号7、8および9の配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3の3つのCDRを含んでなる軽鎖を含んでなる抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片の使用に関する。

【0283】

本態様に関して、本発明は、特に、CXCR4の発現に関連する発がん性障害をインビトロで診断するためまたはCXCR4の発現に関連する発がん性障害の発症につ

10

【0284】

別の態様によれば、本発明は、対象(subject)におけるCXCR4発現腫瘍の存在および／または位置をインビトロで検出する方法であって、前記方法が、(a)それぞれ配列番号4、5および6の配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3の3つのCDRを含んで

20

【0285】

特に、本発明は、対象におけるCXCR4発現腫瘍の存在および／または位置をインビトロで検出する方法であって、前記方法が、

30

(a) 本発明に係るヒト化抗体重鎖および／またはヒト化抗体軽鎖および／またはヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片に対象由来のサンプルを接触させ、かつ

(b) 前記抗体とサンプルの結合を検出することを含んでなる、方法に関する。

【0286】

非限定的例として、そのような検出は、FACSまたは当業者に公知のその他の任意の技術によってなされ得る。

40

【0287】

別の態様によれば、本発明は、対象のCXCR4発現腫瘍におけるCXCR4発現レベルをインビトロで決定する方法であって、前記方法が、(a')それぞれ配列番号4、5および6の配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3の3つのCDRを含んでなる重鎖ならびにそれぞれ配列番号7、8、9の配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3の3つのCDRを含んでなる軽鎖を含んでなる抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的断片に対象由来のサンプルを接触させ

50

60

、かつ(b')前記サンプルにおけるCXCR4への抗体結合レベルを定量化することを含んでなる方法に関する。

【0288】

特に、本発明は、対象由来のCXCR4発現腫瘍におけるCXCR4発現レベルをインビトロで決定する方法であって、前記方法が、

(a') 本発明に係るヒト化抗体重鎖および／またはヒト化抗体軽鎖および／またはヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片に対象由来のサンプルを接触させ、かつ

(b') 前記サンプル中におけるCXCR4への抗体結合レベルを定量化することを含んでなる方法に関する。

【0289】

好ましい実施形態では、CXCR4発現レベルは免疫組織化学(IHC)によって測定される。

【0290】

別の態様によれば、本発明は、CXCR4発現腫瘍をインビトロで診断する方法または対象におけるCXCR4発現腫瘍の発症についての予後をインビトロで決定する方法であって、前記方法が、(i)本発明に従って、特に本発明のヒト化抗体を用いて、CXCR4の発現レベルを決定する工程；および(ii)工程(i)の発現レベルを正常組織由来のCXCR4の参照発現レベルと比較する工程、を含んでなる方法に関する。

【0291】

別の態様によれば、本発明は、対象の腫瘍のCXCR4の状態をインビトロで決定する方法であって、前記方法が、(1)本発明に従って、特に本発明のヒト化抗体を用いて、CXCR4の発現レベルを決定する工程；(2)前記腫瘍をCXCR4発現レベルについてスコア化する工程；および(3)前記スコア化を対照サンプルから得られたものと比較する工程、を含んでなる方法に関する。

【0292】

別の態様によれば、本発明は、発がん性障害が抗CXCR4抗体またはその断片もしくは誘導体を用いた治療に感受性であるかどうかを決定する方法であって、前記方法が、

(a) 本発明に従って対象の腫瘍のCXCR4状態をインビトロで決定する工程；および

(b) 状態がCXCR4(+)であった場合、発がん性傷害が抗CXCR4抗体またはその断片または誘導体を用いた治療に感受性であることを決定する工程を含んでなる方法に関する。

【0293】

別の態様によれば、本発明はCXCR4アンタゴニスト抗腫瘍薬剤として分子をスクリーニングおよび／または同定する方法であって、

61

- a) CXCR4を発現している細胞を選択する工程；
 b) それぞれ配列番号4、5および6の配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3の3つのCDRを含んでなる重鎖ならびにそれぞれ配列番号7、8、9の配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3の3つのCDRを含んでなる軽鎖を含んでなる抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片と前記細胞をインキュベートする工程；
 c) 抗体、またはその機能的断片もしくは誘導体の1つ、とCXCR4との結合を阻害する能力について、被験 10
 分子を評価する工程；および
 d) 前記阻害が可能な分子を選択する工程
 を含んでなる方法に関する。

【0294】

この態様によれば、本発明は特に、CXCR4アンタゴニスト抗腫瘍薬剤として分子をスクリーニングおよび／または同定する方法であって、

- a) CXCR4を発現している細胞を選択する工程；
 b) 本発明に係るヒト化抗体重鎖および／またはヒト化抗体軽鎖および／またはヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片と前記細胞をインキュベートする工程；
 c) 抗体、またはその機能的断片もしくは誘導体の1つ、とCXCR4との間の結合を阻害する能力について、被験細胞を評価する工程；および
 d) 前記阻害が可能な分子を選択する工程
 を含んでなる方法に関する。

【0295】

別の態様によれば、本発明は、それぞれ配列番号4、5および6の配列のCDR-H1、CDR-H2およびC 30
 D R-H3の3つのCDRを含んでなる重鎖ならびにそれぞれ配列番号7、8、9の配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3の3つのCDRを含んでなる軽鎖を含んでなる抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片を少なくとも含んでなるキットであって、前記抗体が好ましくは標識されている、キットに関する。

【0296】

この態様によれば、本発明は特に、少なくとも1つの本発明に係るヒト化抗体重鎖および／またはヒト化抗体軽鎖および／またはヒト化抗体またはその誘導化合物もしくは機能的断片を含んでなるキットであって、前記抗体が好ましくは標識されている、キットに関する。 40

【0297】

別の態様によれば、本発明は、腫瘍のCXCR4状態をインビトロで決定するための本発明に係るキットであって、前記キットが、

- i) 前記抗CXCR4抗体とCXCR4との間の結合の程度を検出するのに有用な試薬；および
 i i) CXCR4発現レベルをスコア化するのに有用な陽性および陰性対照サンプル 50

62

を更に含んでなるキットに関する。

【0298】

好ましくは、抗体またはその機能的断片は、支持体、特にタンパク質チップ上に固定化することができる。そのようなタンパク質チップの1つは本発明の対象である。

【0299】

好ましくは、タンパク質チップは、生体サンプル中のCXCR4を検出および／または定量化するために必要なキットまたは付属物中で使用することができる。

【0300】

本発明において「生体サンプル (biological sample)」という用語は、生きている生物から採取したサンプル（特に、哺乳動物、特にヒトから採取した血液、組織、臓器等のサンプル）またはかかるCXCR4タンパク質の1つを含むと思われる任意のサンプル（例えば、必要に応じて形質転換された、細胞サンプル）に関するということを述べておく必要がある。

【0301】

前記抗体、またはその機能的断片は、検出可能および／または定量化可能なシグナルを得るためのイムノコンジュゲートまたは標識抗体の形態であり得る。

【0302】

本発明の標識抗体、またはその機能的もしくは断片としては、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコースアミラーゼ、カルボニックアンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、リンゴ酸脱水素酵素またはグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ等の酵素とあるいはビオチン、ジギキゲニンまたは5-ブロモ-デオキシウリジン等の分子と組み合わせることができる抗体コンジュゲート（イムノコンジュゲート）が含まれる。蛍光標識、特にフルオレセインおよびその誘導体、蛍光色素、ローダミンおよびその誘導体、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、ダンシル、ウンベリフェロン等も、本発明の抗体またはその機能的断片と組み合わせることができる。そのようなコンジュゲートにおいて、本発明の抗体またはその機能的断片は当業者に公知の方法によって調製することができる。それらは、酵素または蛍光標識と、ポリアルデヒド、グルタルアルデヒド、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) またはジエチレントリアミン五酢酸 (DPTA) 等のスペーサー基または連結基を介して直接結合させてもよく、治療のためのコンジュゲートについて上記で述べたような結合剤の存在下で結合させてもよい。フルオレセイン標識を有するコンジュゲートはイソチオシアナートとの反応によって調製することができる。

【0303】

その他のコンジュゲートとして更に、化学発光標識、例えばルミノールおよびジオキセタン、生物発光標識、例えばルシフェラーゼおよびルシフェリン、または放射性

63

標識、例えばヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹²⁶、ヨウ素¹³³、臭素⁷⁷、テクネチウム^{99m}、インジウム¹¹¹、インジウム^{113m}、ガリウム⁶⁷、ガリウム⁶⁸、ルテニウム⁹⁵、ルテニウム⁹⁷、ルテニウム¹⁰³、ルテニウム¹⁰⁵、水銀¹⁰⁷、水銀²⁰³、レニウム^{99m}、レニウム¹⁰¹、レニウム¹⁰⁵、スカンジウム⁴⁷、テルル^{121m}、テルル^{122m}、テルル^{125m}、ツリウム¹⁶⁵、ツリウム¹⁶⁷、ツリウム¹⁶⁸、フッ素¹⁸、イットリウム¹⁹⁹ およびヨウ素¹³¹ が含まれ得る。直接または前述した E DTA もしくは DTPA 等のキレート化剤を介してラジ

オアイソトープと抗体を結合させるための当業者に公知の従来の方法を診断用ラジオアイソトープに用いることができる。そこで、クロラミン-T 法 [Hunter W.M. and Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495] による [I¹²⁵] Na での標識; Crockford et al. (米国特許第 4, 424, 200 号) に記載されているテクネチウム^{99m} での標識または Hnatowich (米国特許第 4, 479, 930 号) に記載されている DTPA を介した結合を挙げておくべきであろう。

【0304】

バイオマーカーとしての本発明の抗体の使用も開示される。方法は、CXCR4 の発現に関連する種々の過剰増殖発がん性障害 (hyperproliferative oncogenic disorder)、限定されるものではないが例えば乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、皮膚癌、食道癌、肺癌、頭頸部癌、膀胱癌、結腸直腸癌、骨肉腫、神経芽細胞腫、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、リンパ腫、腎癌、膠芽腫、甲状腺癌、横紋筋肉腫、または CXCR4 の発現に関連する任意のその他のがんを検出または診断するために用いられ得る。当業者に理解されるように、特定の障害に関連する抗体発現レベルは予め存在する状態の性質および／または重症度に応じて異なる。

【0305】

当業者に公知の従来の方法のいずれかにおける本発明の抗体の投与 (例えば局所、非経口、筋肉内等) は、サンプル中の異形成細胞を検出する非常に有用な方法であって、CXCR4 の発現に関連するまたは仲介される過剰増殖障害の治療を受けている患者の治療計画を臨床医がモニタリングすることを可能にする方法を提供する。

【0306】

別の実施形態では、本発明は、CXCR4 の発現に関連する発がん性障害をインビボでイメージングするための医薬組成物であって、インビボで CXCR4 に結合する標識された上記モノクローナル抗体またはその断片と薬学的に許容されるキャリアとを含んでなる医薬組成物に関する。

【0307】

64

本発明の抗体またはその機能的断片もしくは誘導体は、CXCR4 の発現に関連する種々の病態の検出、診断、およびステージ分類を含む種々の医学的目的または研究目的に有用であろう。

【0308】

ステージの決定は、潜在的な予後的価値 (prognostic value) があり、最適な治療法をデザインする基準を提供する [Simpson et al. J. Clin. Oncology 18:2059 (2000)]。一般的に、例えば乳癌の病理学的ステージ分類は臨床的ステージ分類よりも正確な予後が分かるため好ましい。しかし、臨床的ステージ分類は、病理学的評価のための組織を得る侵襲的手技に依存しないので、病理学的ステージ分類と同程度に正確であるなら、臨床的ステージ分類が好ましい。

【0309】

好適な標識または他の適切な検出可能な生体分子もしくは化学物質と共に使用される場合、本発明の抗体はインビトロおよびインビボでの診断および予後予測への応用に特に有用である。

【0310】

イムノアッセイで使用するための標識は一般に当業者に公知であり、酵素、ラジオアイソトープ、ならびに蛍光性、発光性および発色性の物質、例えば着色された粒子、例えばコロイド金またはラテックスビーズが含まれる。好適なイムノアッセイには酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) が含まれる。様々な種類の標識および本発明の抗体に標識をコンジュゲートする方法が当業者に周知であり、例えば以下に記載するものがある。

【0311】

本明細書において、「CXCR4 の発現に関連する発がん性障害 (oncogenic disorder)」という用語は、障害に罹患している対象における高レベルまたは異常に低いレベルの CXCR4 (異常) の存在が障害の病態生理であるか障害の悪化に寄与する因子であることが示されているまたは疑われている疾患および他の障害を含むことが意図される。あるいは、そのような障害は、例えば、障害に罹患している対象の冒された細胞または組織の細胞表面上における CXCR4 レベルの増加によって示され得る。CXCR4 レベルの増加は、例えば、本発明の抗体 515H7 または hz 515H7 を用いて検出され得る。更に、比較的自律的な成長を示す細胞を指し、それらは細胞増殖制御の有意な消失を特徴とする異常な成長の表現型を示す。あるいは、細胞は、正常レベルの CXCR4 を発現し得るが、異常な増殖によって特徴付けられる。

【0312】

特定の実施形態では、CXCR4 に関連する場合の「増加した発現」とは、(RNA 発現またはタンパク質発現による測定で) 対照と比べて統計的に有意な発現の増加を示すタンパク質または遺伝子発現レベルを指す。

50

65

【0313】

より具体的には、CXCR4の発現に関連する発がん性障害をインビトロで診断するためまたはCXCR4の発現に関連する発がん性障害、例えばCXCR4の発現に関連するがんの発症についての予後をインビトロで決定するための、前述の本発明に係る抗体またはその機能的断片もしくは誘導体の使用が考えられる。

【0314】

本発明に係る別の広い態様は、対象におけるCXCR4の発現に関連する病的状態への感受性または病的過剰増殖発がん性障害を診断する方法であって、サンプル中のCXCR4を有する細胞の有無を決定することおよび前記CXCR4を有する細胞の有無に基づいて病的状態または病的状態への感受性を診断することを含んでなる方法に関する。本発明の抗体の診断における使用は、原発性腫瘍、がん転移、がん幹細胞を含んでなる。抗体は、検出可能且つ／または定量可能なシグナルが得られるようなイムノコンジュゲートの形態または標識抗体の形態で存在し得る。

【0315】

より具体的には、本発明に係る好ましい主題は、対象においてCXCR4を発現する腫瘍の存在および／または位置をインビトロで検出する方法であって、前記方法が、(a)本発明に係る抗体またはその機能的断片もしくは誘導体に対象由来のサンプルを接触させ、かつ(b)前記抗体とサンプルとの結合を検出することを含んでなる方法である。この主題の別の態様は、臨床試験中、より具体的にはCXCR4受容体のダウンレギュレーションおよびまたは分解が被験化合物の作用機序の一部である時の、CXCR4標的療法に対する応答としてのCXCR4発現の追跡である。

【0316】

当業者に明らかなように、本発明の抗体の結合の検出は種々のアッセイにより示され得る。アッセイを行うための任意の手段を本発明と共に用いることができるが、例としてFACS、ELISAまたはIHCを挙げることができる。

【0317】

本明細書において、「サンプル」という用語は、新生物細胞を含むまたは含むと思われる結腸、胃、直腸、乳房、卵巣、前立腺、腎臓、肺、血液、脳、皮膚、甲状腺、リンパ節、骨髄または他の臓器もしくは組織の細胞等の新生物細胞を含むまたは含む得る、任意の生体液、細胞、組織、臓器、またはその一部を意味することが意図される。この用語は、個体中に存在するサンプルおよび個体から得られたまたは個体由来するサンプルを含む。例えば、サンプルは、生検によって得られた検体の組織切片または組織培養に入れたもしくは適応させた細胞であり得る。サンプルは更に、細胞成分画分もしくは抽出物、または粗もしくは実質的に純粋な核酸分子もしくは

66

タンパク質標品であり得る。

【0318】

臨床サンプルは、対象から得られ且つ例えばCXCR4発現レベルを決定または検出する診断検査またはモニタリング検査等の本発明の方法に有用である様々な種類のサンプルを包含することが意図される。この定義は、外科的切除によって得られた固体組織サンプル、病理標本、保存サンプル、または生検標本、組織培養またはそれに由来する細胞およびその子孫、ならびにこれらの供給源のいずれかから調製された切片またはスメアを包含する。非限定的な例として、結腸、胃、直腸、乳房、卵巣、前立腺、腎臓、肺、血液、脳、皮膚、甲状腺、リンパ節、骨髄等から得られたサンプルが挙げられる。この定義はまた、生体起源の液体サンプルを包含し、その中に懸濁されている細胞もしくは細胞断片または液体培地およびその溶質のいずれかを指し得る。

【0319】

本発明に係る別の態様は、対象から得られたCXCR4発現腫瘍におけるCXCR4発現レベルをインビトロで決定する方法であって、前記方法が、(a')本発明に係る抗体またはその機能的断片もしくは誘導体に対象から得られたサンプルを接触させ、かつ(b')前記サンプルにおけるCXCR4への抗体結合レベルを定量化することを含んでなる方法に関する。

【0320】

当業者に明らかなように、CXCR4への抗体結合レベルは、いくつかの方法で、例えば種々のアッセイによって、定量化され得る。アッセイを行うための任意の手段を本発明と一緒に用いることができるが、好ましい方法は、ELISA法に基づくか、免疫蛍光法によるか、免疫組織化学またはラジオイムノアッセイ(RIA)技術または同等の技術による、免疫酵素的方法を利用する。

【0321】

好ましくは、生体サンプルは生体液、例えば血清、全血、細胞、組織サンプルまたはヒト起源の生検試料で形成される。サンプルは、例えば、CXCR4の発現に関連する病的過剰増殖発がん性障害の存在について好都合にアッセイすることができる生検された組織を含み得る。

【0322】

被験サンプル中に存在するCXCR4の量が決定されたら、その結果を、CXCR4の発現に関連する過剰増殖発がん性障害を有さない個体から被験サンプルと同様にして得た対照サンプルのものと比較することができる。CXCR4レベルが被験サンプルで有意に上昇している場合、それが由来する対象が前記疾患を有するまたは発症する可能性が高くなっていると結論付けることができる。

【0323】

本発明は、より具体的には、対象におけるCXCR4発現腫瘍をインビトロで診断する方法またはCXCR4発

67

現腫瘍の発症についての予後をインビトロで決定する方法であって、前記方法が、(i) 上記CXCR4の発現レベルを決定する工程；および(ii) 工程(i)の発現レベルを正常組織またはCXCR4を発現しない組織のCXCR4参照発現レベルと比較する工程、を含んでなる方法に関する。

【0324】

本願において、疾患を「診断する」とは、例えば、CXCR4の発現に関連するまたは仲介される病的過剰増殖発がん性障害の存在を診断または検出すること、疾患の進行をモニタリングすること、およびCXCR4の発現に関連する障害を示す細胞またはサンプルを同定または検出することを含むことが意図される。

【0325】

本願において、「予後(prognosis)」とは、疾患から回復する可能性または推定される疾患の発症もしくは転帰(outcome)の予測を意味する。例えば、対象から得られたサンプルが本発明の抗体を用いた染色に陽性であった場合、その対象の「予後」は、サンプルがCXCR4染色に陰性であった場合よりも良い。サンプルは、以下で更に詳細に説明されるように適切なスケールに基づいてCXCR4発現レベルについてスコア化され得る。

【0326】

しかし、本発明の別の態様は更に、その作用機序の1つとしてCXCR4の分解を誘導する治療化合物のためにCXCR4発現をモニタリングすることに関する。その場合、細胞膜上でのCXCR4発現の追跡が臨床試験および「テーラーメイド」治療中の処置の有効性を評価する重要なツールとなり得る。

【0327】

CXCR4発現レベルは、好ましくは、「参照レベル」または「参照発現レベル」ともいう対照の細胞またはサンプルにおけるレベルに関連して比較または測定される。「参照レベル」、「参照発現レベル」、「対照レベル」および「対照」は本明細書で同義で使用されている。大まかに言うと、「対照レベル」は、疾患またはがんを一般的に有さない比較可能な対照細胞で測定される別個のベースラインレベルを意味する。これは同じ個体から得られてもよく、病気サンプルもしくは被験サンプルを得た個体と同じ疾患を有さないまたは正常な別の個体から得られてもよい。本発明の文脈で、「参照レベル」という用語は、患者のがん細胞を含むサンプルにおけるCXCR4の発現の試験レベルを評価するために用いられる、CXCR4の発現の「対照レベル」を指す。例えば、患者の生体サンプルにおけるCXCR4レベルがCXCR4の参照レベルより高い場合、細胞はCXCR4の発現が高レベルまたは過剰であると見なされる。参照レベルは複数の方法によって決定することができる。したがって、発現レベルは、CXCR4発現細胞の数に依存

68

せずにCXCR4を有する細胞またはCXCR4発現レベルを定義し得る。したがって、各患者の参照レベルは、本明細書に記載の参照レベルを決定するための方法のいずれかによって決定することができるCXCR4の参照比によって定めることができる。

【0328】

例えば、対照は、種々の形態を取り得る所定の値であり得る。それは中央値または平均値等の単一のカットオフ値であり得る。「参照レベル」は、全ての患者に個々に等しく適用可能な単一の数値であってもよく、具体的な患者小集団に応じて異なってもよい。したがって、例えば、同じがんに対して年長の男性の参照レベルが若い男性と異なることがあり、同じがんに対して女性の参照レベルが男性と異なることがあり得る。あるいは、「参照レベル」は、試験する新生物細胞の組織と同じ組織から得た非発がん性がん細胞におけるCXCR4発現レベルを測定することによって決定されてもよい。また、「参照レベル」は、患者の新生物細胞におけるCXCR4と同じ患者の非腫瘍細胞におけるCXCR4レベルとの特定の比率であり得る。「参照レベル」はまた、腫瘍細胞をシミュレートするようにマニピュレートされ得るまたは参照レベルを正確に決定する発現レベルが得られる任意のその他の様式でマニピュレートされ得るインビトロ培養細胞のCXCR4レベルであり得る。一方、「参照レベル」は、CXCR4レベルが上昇していない群中およびCXCR4レベルが上昇している群中等、同等な群に基づいて確立されてもよい。比較可能な群の別の例は、特定の疾患、状態または症状を有する群および疾患のない群である。所定の値は、例えば、被験集団を、低リスク群、中リスク群、高リスク群等の群に、あるいは第1四分位または第1五分位が最もリスクの低いもしくはCXCR4の量が最も多い個体となり、第4四分位または第5五分位が最もリスクが高いもしくはCXCR4の量が最も少ない個体となる四分位または五分位に均等（または不均等）に分けられるように調整され得る。

【0329】

参照レベルはまた、同じがんを有する患者の集団におけるCXCR4レベルの比較によっても決定され得る。これは、例えば、患者の全コホートがグラフィカルに表され、第1軸がCXCR4レベルを表し、第2軸がコホート中で腫瘍細胞が所定のレベルのCXCR4を発現する患者の数を表す、ヒストグラム分析によって達成され得る。CXCR4が同じまたは同様なレベルのコホートの亜集団集団を特定することにより、2以上の別個の患者群を決定することができる。次いで、これらの別個の群が最も良く区別されるレベルに基づいて参照レベルを決定することができる。参照レベルは、1つがCXCR4である2種以上のマーカーのレベルを表してもよい。2種以上のマーカーは例えば各マーカーレベルの値の比率によって表され得る。

69

【0330】

同様に、健康と思われる集団は、CXCR4の発現に関連する状態を有することが知られている集団とは異なる「正常」範囲を有する。したがって、選択される所定の値は、個体が分類されるカテゴリーを考慮したものであり得る。適切な範囲およびカテゴリーは、当業者による日常的な実験によって選択することができる。「上昇」「増加」とは、選択された対照と比べて高いことを意味する。通常、対照は、適切な年齢範囲の健康で正常と思われる個体に基づく。

【0331】

また、本発明に係る対照は、所定の値に加えて、実験材料と並行して試験される材料のサンプルであり得ると理解される。例としては、同じ対象から同時に得られた組織または細胞、例えば対象から得られた1つの生検試料の一部または1つの細胞サンプルの一部が含まれる。

【0332】

CXCR4仲介疾患の患者の臨床診断またはモニタリングでは、正常対象または非がん組織から得た対応する生検サンプルにおけるレベルと比較したCXCR4発現細胞の検出またはCXCR4レベルの増加により、一般的に、CXCR4仲介障害を有するまたは有することが疑われる患者が示される。

【0333】

上記に基づいて、本発明は、組織サンプルにおけるCXCR4発現レベルを検出することを含んでなり、その存在ががんへの感受性(susceptibility)を示し、CXCR4発現の程度が感受性の程度に相関する、がんへの感受性を予測する方法を提供する。したがって、具体的な実施形態では、乳房組織、卵巣組織、前立腺組織、膵臓組織、皮膚組織、食道組織、肺組織、頭頸部組織、膀胱組織、結腸直腸組織、骨肉腫組織、神経芽細胞腫組織、急性リンパ性白血病細胞、急性骨髄性白血病細胞、慢性骨髄性白血病細胞、慢性リンパ性白血病細胞、多発性骨髄腫細胞、リンパ腫細胞、腎臓組織、膠芽腫組織、甲状腺組織、横紋筋肉腫組織、またはCXCR4を発現する細胞が疑われる任意の他の組織におけるCXCR4の発現が検査され、サンプル中のCXCR4の存在により、がん感受性または組織特異的腫瘍の出現もしくは存在の兆候が示される。

【0334】

腫瘍の攻撃性を評価する方法も提供される。一実施形態では、個体における悪性腫瘍の進行を経時的に観察する方法が、腫瘍サンプル中の細胞によって発現されるCXCR4のレベルを決定すること、そのようにして決定されたレベルを、同じ個体から異なる時点に採った同等な組織サンプルにおいて発現されるCXCR4のレベルと比較することを含んでなり、腫瘍サンプルにおける経時的なCXCR4発現の程度からがんの進行についての情報が得られる。

70

【0335】

更に別の実施形態では、本願は、対象に適した治療プロトコルを決定する方法を提供する。

【0336】

本発明に係るCXCR4の有無またはCXCR4レベルの変化は、対象が再発性、進行性、または持続性のCXCR4に関連するがんを有しやすいことを示し得る。したがって、CXCR4を発現する細胞数の増加または種々の組織もしくは細胞に存在するCXCR4濃度の変化を測定することにより、CXCR4に関連する悪性腫瘍を改善するための特定の治療計画が有効であるかどうかを決定することができる。

【0337】

本発明の別の主題は、CXCR4の発現に関連する発がん性障害のインビボでのイメージング法である。例えば、そのような方法は、発がん性障害の症状を呈する患者に用いることができる。例えば患者のCXCR4発現レベルが増加している場合、患者はがん性障害に罹りやすい。また、この方法は、CXCR4によって仲介されるがんを過去に診断された患者における進行および／または治療への反応をモニタリングするのに有用であり得る。上記目的に基づいて、本発明は、好ましくは標識された、特に放射性標識された、本発明に係る抗体、またはその機能的断片もしくは誘導体、を含んでなるインビボイメージング試薬および医学的イメージングにおけるその使用を提供する。したがって、本発明に係る一般的な方法は、前述の標識されたモノクローナル抗体等のイメージング有効量のイメージング試薬および薬学的に有効なキャリアを患者に投与し、その後、サンプル中に存在するCXCR4に薬剤が結合した後に薬剤を検出することによって作用する。特定の実施形態では、方法は、ターゲティング部分および活性部分を含んでなるイメージング有効量のイメージング剤を投与することによって作用する。イメージング剤は、ヒト等の哺乳動物における診断使用に有効な量で投与され、その後、イメージング剤の局および蓄積が検出される。イメージング剤の局および蓄積は、放射性核種のイメージング、ラジオシンチグラフィ、核磁気共鳴画像法、コンピューター断層撮影法、陽電子放射断層撮影法、コンピューター体軸断層撮影法、X線または磁気共鳴画像法、蛍光検出、および化学発光検出によって検出され得る。

【0338】

標的化された抗腫瘍療法の開発に関して、免疫組織学的技術を用いた診断は、受容体発現レベルに関するinsitu情報を提供するので、そのような治療に必要な受容体発現レベルに基づいて治療に感受性である患者を選択することを可能にする。

【0339】

モノクローナル抗体を用いた免疫療法では、ヒト化抗Her2モノクローナル抗体トラスツズマブが出現して乳

71

癌におけるHer2過剰発現の決定が現在臨床的に重要であるトラスツズマブを用いた治療と同様に、治療に対する反応は標的受容体発現レベルに依存する。トラスツズマブはHer2過剰発現がん細胞を特異的にターゲティングすることによって作用するので、トラスツズマブを用いた治療にはHer2過剰発現を示すことが必須である。Her2の正確な検査は、高価で潜在的に毒性であるトラスツズマブ治療を非過剰発現腫瘍患者に与えないことおよびトラスツズマブの恩恵を受け得る全患者が適切な治療を受けるようにすることを目的としている。

【0340】

Her2を過剰発現した患者の選択に関するトラスツズマブを用いた教示で、モノクローナル抗体を用いた治療法を用いる時に受容体の発現レベルを決定することおよび治療用のモノクローナル抗体と同時に患者の選択に用いることができるモノクローナル抗体を開発することの利点が示された。

【0341】

したがって、本発明は、対象の腫瘍のCXCR4状態をインビトロで決定する方法であって、前記方法が、(1) 上記CXCR4の発現レベルを決定する工程、(2) 前記腫瘍をCXCR4発現についてスコア化する工程、および(3) 前記スコア化を対照サンプルから得られたものと比較する工程、を含んでなる方法に関する。

【0342】

本発明の意味における「CXCR4状態」とは、免疫組織化学(IHC)、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)、染色体in situハイブリダイゼーション(CISH)、遺伝子チップまたは当業者に公知のその他の方法等の任意の方法によって測定されるCXCR4遺伝子発現レベルの決定に基づいたCXCR4陽性[CXCR4(+)]、CXCR4陰性[CXCR4(-)]クラスへの腫瘍の分類に関する。

【0343】

好ましい実施形態では、診断のための抗体は、組織サンプルがホルマリン固定、Glyco-fix固定、パラフィン包埋および/または凍結された時に標的受容体に結合できなければならない。

【0344】

より具体的には、CXCR4発現レベルは免疫組織化学(IHC)によって測定される。

【0345】

例えば、サンプルは抗体染色のレベル0~3+のスケールでCXCR4発現レベルについてスコア化され得、ここで、半定量的な4段階の強度増加で0は陰性、1+~3+は陽性の染色を表す。各陽性スコアはスコア0(陰性)と比べて再発および致死性の疾患のリスクの有意な低下に関連し得るので、スコア1+~3+は陽性として記録することができるが、陽性スコア間の強度増加は更なるリスク低下を示し得る。CXCR4の予後的価値を

72

評価するために任意の従来のハザード分析法が用いられ得る。代表的な分析法としては、打ち切り例存在下での生存または時間と事象のデータをモデル化するためのセミパラメトリックな方法であるコックス比例分析(Hosmer and Lemeshow, 1999; Cox, 1972)が含まれる。他の生存分析、例えば生命表またはカプラン・マイヤー法と異なり、コックスはモデルに予測変数(共変数)を含めることができる。従来の分析法、例えばコックスを用いて、原発性腫瘍におけるCXCR4発現状態と疾患再発の発生までの時間(無症候生存時間または転移疾患までの時間)または疾患による死亡までの時間(全生存時間)のいずれかとの相関に関する仮説を調べることが可能であり得る。コックス比例分析は、コックス比例ハザード分析としても知られる。この方法は、患者生存時間に対する腫瘍マーカーの予後的価値を試験するための標準的方法である。多変量モードで用いた時、複数の共変数の影響が並行して試験され、その結果、独立した予後的価値を有する個々の共変数、すなわち最も有用なマーカーを同定することができる。腫瘍の陽性または陰性の「CXCR4状態」、[CXCR4(+)]またはCXCR4(-)ともいうという用語はそれぞれスコア0またはスコア1+~3+を指す。

【0346】

サンプルは乳癌の診断またはモニタリング中に「スコア化」され得る。最も簡単な形態では、スコア化は、免疫組織化学によるサンプルの視覚検査によって判定されるカテゴリー的な陰性または陽性であり得る。より定量的なスコア化では、染色強度およびサンプル採取された染色(「陽性」)細胞の割合の2つのパラメーターを判定する。これら2つのパラメーターに基づいて、陽性染色の増加が反映されるように数値が割り当てられ得る。Allred et al (Allred, Harvey et al. 1998)は、これを達成する方法の1つを記載しており、その方法では、0(陰性)~3+のスケールで両パラメーターをスコア化し、個々のパラメーターのスコアを全体スコアへと集計する。これにより、可能なスコアが0、2、3、4、5、6、7または8であるスケールが得られる(Allredのスケールではスコア1は可能でないことに注意された)。それより幾分簡単なスコア化方法では、核染色の強度および染色された核を示す細胞の割合をまとめて0~3+の複合スケールにする。いずれのスコア化方法も、細胞核中の活性化されたStat5の染色の強度および割合のスコア化に適用され得る。本明細書で使用される腫瘍の陽性または陰性の「CXCR4状態」という用語は、簡略化したスケールでそれぞれスコア0または1+~3+に対応するCXCR4の発現レベルを指す。

【0347】

一般的に、本発明に係る試験またはアッセイの結果は、種々のフォーマットのいずれかで示されてもよい。結果は定性的な様式で示されてもよい。例えば、試験報告で、

特定のポリペプチドが検出されたかどうかだけが、おそらくは検出限界と共に、示されてよい。結果は、半定量的様式で示されてもよい。例えば、種々の範囲が定義され得、この範囲に、ある程度の定量的情報を与えるスコア（例えば1+〜3+）が割り当てられてよい。そのようなスコアは、種々のファクター、例えばCXCR4が検出される細胞の数、シグナルの強度（CXCR4の発現レベルまたはCXCR4を有する細胞を示し得る）等を反映し得る。結果は、定量的様式、例えばポリペプチド（CXCR4）が検出される細胞のパーセンテージやタンパク質濃度等として示されてもよい。当業者に理解されるように、試験によって得られる結果の種類は、ポリペプチドの検出に関連する試験の技術的限界および生物学的意義に応じて変わり得る。例えば、特定のポリペプチドの場合、完全に定性的な結果（例えば特定の検出レベルでポリペプチドが検出されるかどうか）によって意義のある情報が得られる。より定量的な結果（例えば、正常レベルに対する被験サンプル中のポリペプチド発現レベルの比率）が必要な場合もある。

【0348】

より好ましい実施形態では、CXCR4発現レベルのスコア化は、反応生成物の強度および陽性細胞のパーセンテージの評価に基づいて0〜3+に段階評価される。更に分かり易いように、これらのパラメーターを以下の表5に要約する。浸潤腫瘍の完全に膜の周囲における反応性のみを考慮すべきであり、これは見た目が「チキンワイヤー」に似ていることが多かった。今回の指針では、IHCでCXCR4のボーダーライン（2+以上のスコア）としてスコア化されたサンプルは、CXCR4（+）と見なす必要があり、更なる評価が必要である。もしも、限定されるものではないが、対照が予想された通りでない場合、サンプルのほとんどにアーチファクトの影響がある場合、および正常な乳管（内部対照）のサンプルが膜における強い陽性を示す（過剰な抗原検出を示唆する）場合、IHC分析を不適とし、繰り返すか、FISCHまたは任意の他の方法で試験すべきである。

【0349】

【表5】

表5

CXCR4 状態	IHCの説明
0	反応性なしまたは腫瘍細胞の10%未満で膜反応性
1 ⁺	10%を超える腫瘍細胞でわずか／わずかに知覚可能な膜反応性が検出される。細胞は膜の一部でのみ免疫反応性である。
2 ⁺	10%を超える腫瘍細胞で弱〜中程度の完全に膜における反応性が見られる。
3 ⁺	10%を超える腫瘍細胞で強く完全な反応性が見られる。

【0350】

本発明に係る方法のより好ましい実施形態では、前記スコア化は、染色の強度および陽性細胞のパーセンテージの2つのパラメーターに基づく適切なスケールの使用を含んでなる。

【0351】

好ましい実施形態では、本発明に係る方法の適切なスケールは、腫瘍細胞の膜反応性（membranous reactivity）なしが0にスコア化され、10%を超える腫瘍細胞での強く完全な反応性が3+にスコア化される、0〜3+のスケールである。

【0352】

より具体的には、前述のように、前記適切なスケールは、腫瘍細胞の膜反応性なしが0にスコア化され；10%を超える腫瘍細胞におけるかすかに知覚可能な膜反応性が1+にスコア化され、10%を超える腫瘍細胞における弱〜中程度の完全な膜反応性が2+にスコア化され；10%を超える腫瘍細胞における強力な完全な反応性が3+にスコア化される、0〜3のスケールである。

【0353】

本発明の特定の態様によれば、腫瘍はスコアが2+のCXCR4（+）である。

【0354】

本発明の特定の態様によれば、腫瘍はスコアが3+のCXCR4（+）である。

【0355】

本発明の別の特定の態様によれば、腫瘍はスコアが2+または3+のCXCR4（+）である。

【0356】

本発明によれば、本発明は更に、発がん性障害が抗CXCR4抗体またはその断片もしくは誘導体を用いた治療に感受性であるかどうかを決定する方法であって、前記方法が、（a）前述したように対象の腫瘍のCXCR4状態をインビトロで決定する工程および（b）状態がCXCR4（+）であった場合に、発がん性障害が抗CXCR4抗体またはその断片もしくは誘導体を用いた治療に感受性であるかどうかを決定する工程、を含んでなる方法に関する。

【0357】

本発明の別の態様によれば、本発明の抗体を含んでなる、そのような診断または予後予測方法に有用なキットも考えられる。

【0358】

便利なように、パッケージ化された所定量の試薬の組合せと診断アッセイを実施するための説明書、例えばキットも本発明の範囲内である。キットは、例えばELISAまたはウェスタンブロットでCXCR4をインビトロで検出および定量化するための抗体を含む。本発明の抗体は、例えばELISAまたはウェスタンブロットにおいてCXCR4をインビトロで検出および定量化するためのキット中に提供され得る。抗体が酵素で標識される場合、キットは、酵素に要求される基質および補因子（例えば、検出可能な発色団またはフルオロフォアを提供する基質前駆物質）を含む。更に、安定化剤、バッファー（例えばブロックバッファーまたは溶解バッファー）

75

等のその他の添加剤も含まれ得る。そのようなキットは、バイアル、チューブ等の1または複数の容器 (container) を収納するように区画化された収納容器 (receptacle) を含んでなってもよく、そのような容器に本発明の別個の構成要素が収容される。例えば、1つの容器には、不溶性または一部可溶性のキャリアに結合した第1の抗体が含まれ得る。第2の容器には、凍結乾燥された形態または溶液の形態で、可溶性で検出可能な標識された第2の抗体が含まれ得る。収納容器は、凍結乾燥形態または溶液形態の検出可能な標識された第3の抗体を収容する第3の容器を含んでもよい。このような性質のキットは、本発明のサンドイッチアッセイにおいて使用することができる。ラベルまたは添付文書により、組成物の説明および意図されるインビトロまたは診断で使用するための指示が提供され得る。

【0359】

種々の試薬の相対量は、アッセイの感度を実質的に最適化する試薬溶液濃度が得られるように大きく異なっており。特に、試薬は、溶解されて適切な濃度の試薬溶液を提供する補形剤を含む、通常は凍結乾燥された、乾燥粉末として提供され得る。

【0360】

本発明の更に別の態様によれば、本明細書中に詳述されているモノクローナル抗体またはその結合断片は、検出可能な部分で標識されて提供され、前述の抗原を有する細胞を診断または同定するための例えばキット中にパッケージ化されて使用されてよい。そのような標識の非限定的な例としては、フルオレセインイソチオシアネート等のフルオロフォア；発色団、放射性核種、または酵素が含まれる。そのような標識された抗体または結合断片は、例えば、抗原の組織学的局在、ELISA、セルソーティング、ならびにCXCR4およびこの抗原を有する細胞を検出または定量化するその他の免疫学的技術に用いられ得る。

【0361】

アポトーシスアッセイ、細胞からのCXCR4の精製または免疫沈降のための陽性対照として有用なキットも提供される。CXCR4を単離および精製するために、キットは、ビーズ (例えばセファロースビーズ) にカップリングした本明細書に記載の抗体またはその抗体結合断片を含んでよい。CXCR4をインビトロ (例えばELISAまたはウェスタンブロット) で検出および定量化するための抗体を含むキットが提供され得る。製造物と共に、キットは、容器と、容器上のまたは容器に付随するラベルまたは添付文書とを含んでなる。容器は、少なくとも1つの本発明の抗CXCR4抗体またはその結合断片を含んでなる組成物を収容する。例えば希釈剤およびバッファー、対照抗体を含む更なる容器を含めてもよい。ラベルまたは添付文書は、組成物の説明および意図されるインビトロまたは診断での使用のための指示を提

76

供し得る。

【0362】

より具体的には、本発明は、当業者に公知の任意の方法により腫瘍のCXCR4状態を決定するためのキットに関する。好ましい実施形態では、実施例に記載されるように、本発明は、IHCの方法により腫瘍のCXCR4状態を決定するためのキットに関する。

【0363】

特定の実施形態では、本発明は、前述した少なくとも1つの抗CXCR4抗体またはその機能的断片もしくは誘導体を含んでなるキットにあり、前記抗体は好ましくは標識されている。

【0364】

例えば前述の標識の使用を初めとする任意の標識方法が当業者によって用いられ得ると理解されなければならない。

【0365】

好ましい実施形態では、対象におけるCXCR4発現腫瘍の存在および/または位置をインビトロで検出するのに有用な本発明に係るキットは、前記抗CXCR4抗体とCXCR4との間の結合の程度を検出するのに有用な試薬を更に含んでなる。

【0366】

別の好ましい実施形態では、CXCR4発現腫瘍におけるCXCR4発現レベルをインビトロで決定するのに有用な本発明のキットは、前記標識抗体とCXCR4との間の結合レベルを定量化するのに有用な試薬を更に含んでなる。

【0367】

更に別の実施形態では、腫瘍のCXCR4状態をインビトロで決定するのに有用な本発明に係るキットは、
i) 前記標識抗体とCXCR4との間の結合の程度を検出するのに有用な試薬；および
ii) CXCR4発現レベルをスコア化するのに有用な陽性および陰性対照サンプルを更に含んでなる。

【0368】

腫瘍のCXCR4状態をインビトロで決定するための前記キットは、マウス抗体に特異的なポリクローナル抗体を更に含んでなっており、好ましくはマウス抗体に特異的な前記ポリクローナル抗体は標識されている。

【0369】

本発明は更に、CXCR4を発現または過剰発現する細胞へと生物学的活性化化合物を特異的にターゲティングするための薬物の製造における本発明に係る抗体の使用に関する。

【0370】

本明細書において、「生物学的活性化化合物」とは、細胞活性、特に成長、増殖、転写および遺伝子翻訳を調節、特に阻害できる任意の化合物である。

77

【0371】

本発明は更に、好ましくは標識された、特に放射性標識された本発明に係る抗体またはその機能的断片で構成されるインビボ診断試薬および医学的イメージングにおける、特にCXCR4の細胞発現または過剰発現に関連するがんを検出するための、その使用に関する。

【0372】

本発明は更に、薬物として用いられる、本発明に係る組合せ物としての組成物または抗CXCR4／毒素コンジュゲートもしくはラジオアイソトープに関する。

【0373】

好ましくは、組合せ物としての前記組成物または前記コンジュゲートに補形剤および／または薬学的賦形剤が添加される。

【0374】

本明細書において、「薬学的賦形剤 (pharmaceutical vehicle)」とは、二次的な反応を生じさせずに、例えば活性化化合物の投与を容易にするか、生物中でのその寿命および／または有効性を増加させるか、溶液中での溶解性を上昇させるか、保存性を高める、医薬組成物に入れられる化合物または化合物の組合せを意味する。そのような薬学的キャリアは周知であり、選択される活性化化合物の性質および投与経路に応じて当業者により適応される。

【0375】

好ましくは、そのような化合物は、全身経路によって、特に静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下または経口経路によって投与される。より好ましくは、本発明に係る抗体で構成される組成物は、等間隔で時間を空けて複数回に分けて投与される。

【0376】

それらの投与経路、投薬スケジュールおよび最適な生薬形態は、患者に適した治療を確立する時に一般的に考慮される基準、例えば患者の年齢または体重、全身状態の重症度、治療に対する許容度および副作用歴等に基づいて決定することができる。

【0377】

したがって、本発明は、CXCR4を発現または過剰発現する細胞に生物学的活性化化合物を特異的にターゲティングするための薬物製造における抗体、またはその機能的断片の1つ、の使用に関する。

【0378】

既に示されているように、本発明に係るCXCR4 Mabは、がんの治療において強力な活性を有するので、がんを治療するためのCXCR4アンタゴニスト抗腫瘍薬剤を同定するためのスクリーニングアッセイに使用することができる。これらのアッセイの最初の工程では、CXCR4発現細胞を本発明の抗体とインキュベートし、その後、抗体結合を阻害する能力について分子を評価することができる。この種のアッセイに用いられる細胞

78

はトランスフェクトされた細胞系、例えばCHO-CXCR4、NIH3T3-CXCR4、またはCXCR4でトランスフェクトされたヒト細胞系、例えばU373-MAGI-CXCR4、CXCR4を発現するヒト細胞系、例えばNALM6または初代細胞、例えばPBMCであり得る。CXCR4発現細胞上での抗体結合を阻害するCXCR4のアンタゴニストをスクリーニングするために用いられる方法は、Zhao Q. et al. (AIDS Research And Human Retroviruses, 2003, 19, pp947-955)に記載されている細胞ベースの競合的酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) またはJuarez J. et al. (Leukemia 2003, 17, pp1294-1300)に記載されているような蛍光標示式細胞分取 (FACS) を用いたプロトコルであり得る。

【0379】

したがって、本発明の特定の態様によれば、

- a) CXCR4を発現する細胞を選択する工程；
 - b) 前記細胞を、本発明の抗体、またはその機能的断片もしくは誘導体の1つ、とインキュベートする工程；
 - c) 抗体、またはその機能的断片もしくは誘導体の1つ、とCXCR4との結合を阻害する能力について、被験分子を評価する工程；および
 - d) 前記阻害が可能な分子を選択する工程
- を含んでなる、CXCR4アンタゴニスト抗腫瘍薬剤として分子をスクリーニングおよび／または同定する方法が考えられる。

【0380】

実施例および上記にレジェンドを示した図を用いた説明中で本発明のその他の特徴および利点が更に明らかになる。

【実施例】

【0381】

実施例1：癌細胞におけるCXCR4およびCXCR2の発現

—Q-PCR分析：

リアルタイムRT-PCRを用いて、種々のがん細胞系におけるCXCR4およびCXCR2の相対的発現を定量化した。

【0382】

RNeasy MiniまたはMidiprotocol (キアゲン社、フランス) を用いて種々の細胞系からRNAサンプルを抽出した。次いで、Experion自動電気泳動システム (BIO-RAD社、フランス) を用いてRNAサンプルを制御し、良好な品質／完全性であることを示した。iScript cDNA Synthesisキット (BIO-RAD社、フランス) を用いて1μgの各RNAサンプルをcDNA鋳型に変換した。CXCR2にはTaqManプローブ、CXCR4にはSYBERGreenを用いて、qPCRによりcDNAレベルを定量化した。サンプルを比較する

79

ためには標準化が必要であるので、内部参照RPL0を含めた。TaqManプローブ(CXCR2に使用)は5' FAMレポーター標識および3' TAMRA消光基を有する。50℃で2分間および95℃で10分間加熱することによりPCR酵素を活性化した。5μlのcDNA鋳型(1/20希釈)、1×qPCR Master mix (TaqMan Universal PCR Master Mix、アプライドバイオシステムズ社、米国ニュージャージー州ブランチバーク)、50~900nMの各プライマー、および50~100nMの10
 プローブを含む合計体積50μlのPCRミックス中において95℃で15秒間および62℃で1分間を40または45サイクル行う2工程の手順を用いた。全ての反応はiCycler機(BIO-RAD社)を用いて行った。Q-PCRはサイクル閾値(Ct)を決定することができる。Ct値が小さいほど、被験遺伝子の発現が多い。ヒトリボソームタンパク質である大きなP0用のプライマーおよびプローブには、
 フォワードプライマー: 5'-GAAACTCTGCA TTCTCGCTTCCTG-3' (配列番号63); 20
 リバースプライマー: 5'-AGGACTCGTTTG TACCCGTTGA-3' (配列番号64);
 プローブ: 5-(FAM)-TGCAGATTGGCT ACCCAACTGTTGCA-(TAMRA)-3' (配列番号65)
 を用いた。

【0383】

ヒトCXCR4(ケモカイン受容体4)用のプライマーには、
 フォワードプライマー: 5'-CTCCTTCATCC 30
 TCCTGGAAATC-3' (配列番号66);
 リバースプライマー: 5'-CCAAGGAAAGCA TAGAGGATGG-3' (配列番号67)
 を用いた。

【0384】

ヒトCXCR2(ケモカイン受容体2)用のプライマーおよびプローブには、
 フォワードプライマー: 5'-GTGGTCATTAT CTATGCCCTGG-3' (配列番号68);
 リバースプライマー: 5'-CGACCCTGCTGT 40
 ATAAGATGAC-3' (配列番号69);
 プローブ: 5-(FAM)-TATTTCCTGCTG AGCCTGCTGGGAAA-(TAMRA)-3' (配列番号70)
 を用いた。

【0385】

本発明者らの比較実験では、2つの遺伝子[被験遺伝子(CXCR4およびCXCR2)およびRPL0]の発現を、被験細胞系および参照細胞系の2つの異なるサンプルで定量化した。参照細胞系は、定量化する遺伝子の 50

80

発現が最も少ない細胞系に相当する。遺伝子発現の比較計算は以下の式を用いてなされた:

$$\text{相対遺伝子発現} = (1 + E_{\text{遺伝子}})^{-\Delta Ct(1)} / (1 + E_{\text{RPL0}})^{-\Delta Ct(2)}$$

$E_{\text{遺伝子}}$ = 定量化する遺伝子のプライマー/プローブを用いたPCR効率

E_{RPL0} = RPL0プライマー/プローブを用いたPCR効率

Ct = 閾値サイクル

$\Delta Ct(1)$ = $Ct_{\text{遺伝子}}$ (被験細胞系) - $Ct_{\text{遺伝子}}$ (参照細胞系)

$\Delta Ct(2)$ = Ct_{RPL0} (被験細胞系) - Ct_{RPL0} (参照細胞系)

【0386】

一連のPCRそれぞれについて、相対的な遺伝子定量値を計算し、がん細胞系を、その発現レベルを考慮して、最も多い群から陰性の群へと分類した。全データを図1Aおよび1Bに示す。CXCR2の場合のDU145およびU-87MGを除いて、試験した全てのがん細胞系がCXCR4(図1A)およびCXCR2(図1B)を発現していた。

【0387】

-FACS分析:

MDA-MB-231、PC3およびU937がん細胞系に透過処理を行い、その後、10μg/mLの抗CXCR4モノクローナル抗体[44717(R&Dシステムズ社)対そのアイソタイプ対照IgG2b(シグマ社)]または10μg/mLの抗CXCR2モノクローナル抗体(抗h-CXCR2、クローン48311、R&Dシステムズ社、Mab 331対そのアイソタイプ対照IgG2a)のいずれかとインキュベートした。次いで、1%BSA/PBS/0.01%NaN3で細胞を洗浄した。次に、Alexa標識された二次抗体を細胞に添加し、4℃で20分間インキュベートした。その後、細胞を再度2回洗浄した。2回目の洗浄後、FACS分析を行った。これらの結合実験の結果を図2に示す。MDA-MB-231、PC3、U937等の腫瘍細胞はCXCR4およびCXCR2タンパク質の両方を発現していた。

【0388】

実施例2: ヒトCXCR4に対するモノクローナル抗体(Mab)の作製

CXCR4に対するモノクローナル抗体を作製するために、組換えNIH3T3-CXCR4細胞ならびに/またはCXCR4の細胞外のN末端およびループに相当するペプチドでBalb/cマウスを免疫化した。最初の免疫化後に6~16週齢のマウスを、フロイント完全アジュバント中で抗原を用いて皮下(s.c.)に一度免疫化し、その後、フロイント不完全アジュバント中で抗原を用いて皮下に2~6回免疫化を行った。眼窩後出血

81

によって免疫応答をモニタリングした。ELISAで血清をスクリーニングし（後述）、抗CXCR4抗体の力価が高いマウスを融合に用いた。屠殺して脾臓を取り出す2日前にマウスの静脈内に抗原の追加免疫を行った。

【0389】

—ELISA

抗CXCR4抗体を産生するマウスを選択するために、免疫化したマウスから得られた血清をELISAで調べた。簡潔に述べると、マイクロタイタープレートを、5 μg等量ペプチド/mLでBSAにコンジュゲートされた精製 [1-41] N末端ペプチドでコーティングし、100 μL/ウェル、4℃で一晩インキュベートした後、250 μL/ウェルの0.5%ゼラチンを含むPBSでブロッキングした。CXCR4免疫化マウスの血漿希釈物を各ウェルに添加し、37℃で2時間インキュベートした。プレートをPBSで洗浄した後、HRPがコンジュゲートされたヤギ抗マウスIgG抗体（ジャクソン・ラボラトリーズ社）と37℃で1時間インキュベートした。洗浄後、TMB基質でプレートを発色させ、100 μL/ウェルの1M H₂SO₄を添加することで5分後に反応を停止させた。最も大きな力価の抗CXCR4抗体を作ったマウスを抗体作製に用いた。

【0390】

—CXCR4に対するMabを産生するハイブリドーマの作製

最も力価が大きい抗CXCR4抗体を作ったBalb/cマウスから単離したマウス脾細胞を、PEGを用いてマウス骨髓腫細胞系Sp2/0と融合させた。細胞を約1×10⁵/ウェルでマイクロタイタープレートにプレATINGした後、ultra culture medium+2mM L-グルタミン+1mM ビルビン酸ナトリウム+1×HATを含む選択培地中で2週間インキュベートした。次いで、抗CXCR4モノクローナルIgG抗体についてELISAでウェルをスクリーニングした。次いで、抗体を分泌するハイブリドーマを、限界希釈により少なくとも2回サブクローニングし、インビトロで培養して抗体を作製し、更に分析した。

【0391】

実施例3：抗CXCR4 Mab 515H7の結合特異性およびがん細胞系認識のFACSによる特徴解析
本実験では、抗CXCR4 Mab 515H7のヒトCXCR4への特異的結合をFACS分析によって調べた。

【0392】

NIH3T3、NIH3T3-hCXCR4トランスフェクト細胞、MDA-MB-231、HelaおよびU937がん細胞系を、10 μg/mLのモノクローナル抗体515H7と一緒にインキュベートした。次いで、1%BSA/PBS/0.01%NaN₃で細胞を洗浄した。次に、Alexa標識二次抗体を細胞に添加し、

82

4℃で20分間インキュベートした。次いで、細胞を再度2回洗浄した。2回目の洗浄後、FACS分析を行った。これらの結合実験の結果を以下の表6に示す。表は、抗CXCR4 Mab 515H7がヒトCXCR4-NIH3T3トランスフェクト細胞系に特異的に結合したが、元のNIH3T3細胞上では認識がなかったこと〔FACSで得られた平均蛍光強度（MFI）〕を示している。このMabは、ヒトがん細胞系、例えばMDA-MB-231乳癌細胞、U937前骨髄球がん細胞およびHela子宮頸癌細胞も認識することができた。

【0393】

抗CXCR4 Mab 515H7は、NIH3T3-hCXCR4形質移入体を認識したが、元のNIH3T3野生型細胞は認識しなかった。Mab 515H7はがん細胞系も認識することができた。

【0394】

【表6】

表6

クローン (10 μg/ml)	細胞系の MFI				
	NIH3T3	NIH3T3-CXCR4	MDA-MB-231	Hela	U937
515H7	16	2752	239	1851	645

【0395】

実施例4：ヒトCXCR4受容体を安定的に発現するCHO-K1膜における^[125I]SDF-1と抗CXCR4 Mab 515H7の競合結合

このアッセイでは、オルソステリックまたはアロステリックな結合部位において、ヒトCXCR4受容体への放射標識^[125I]SDF-1の結合に515H7 Mabが競合する能力を評価することができる。

【0396】

ヒトCXCR4受容体の全コード配列（参照配列NM_003467）を有する哺乳動物用発現ベクターでナイーブCHO-K1細胞（ATCC CCL-61）をトランスフェクションすることにより、ヒトCXCR4受容体を安定的且つ構成的に発現するCHO-K1細胞を得た。完全培養培地〔5%ウシ胎児血清（FCS）および500 μg/mLのジェネテシンを添加したDMEM-Ham's F12〕中で細胞を増殖させた。溶解バッファー〔Hepes 20mM、pH7.4、NaCl 150mM〕中でCHO/CXCR4細胞を機械的に破碎した後、遠心（10000g、15分間）して得られた細胞膜上で、放射性リガンド結合実験を行った。^[125I]SDF-1（比活性：1500 Ci/mmole）の結合は、SPA法（シンチレーション近接アッセイ、GEヘルスケア社）を用いて行った。簡潔に述べると、細胞膜（30 μg/ウェル）を、結合バッファー〔Hepes 20mM、pH7.4、CaCl₂ 1mM、MgCl₂ 5mM、NaCl 150mM、BSA 1%〕中で、評価する化合物（SDF-1またはMab）、放射性リガンド（1 nM）および最後にSPA-

83

WGA-PVTビーズ (7.3mg/ウェル) と一緒にインキュベートした。25℃で1時間後に結合平衡に達した。遠心 [1000gで10分間] 後、シンチレーションカウンター (TopCount、パーキンエルマー社) を用いて放射線数を測定した。10μMの非標識SDF-1存在下で非特異的結合を推定した。

【0397】

非標識SDF-1は、 $[^{125}\text{I}]$ SDF-1結合を用量依存的に阻害し、 pK_i 値 (IC_{50} = 特異的 $[^{125}\text{I}]$ SDF-1結合を50%阻害するリガンド濃度) は 7.75 ± 0.27 nM ($n=4$) であった (図3A)。同じ実験条件下で、515H7 (100nM) は、 $[^{125}\text{I}]$ SDF-1結合と効率的に競合した ($[^{125}\text{I}]$ SDF-1の阻害率: $64 \pm 3\%$) (図3B)。

【0398】

実施例5: 抗CXCR4 Mab 515H7による、野生型CXCR4受容体を発現する細胞膜における $[^3\text{S}]$ GTPγS結合の調節

この機能的アッセイでは、野生型ヒトCXCR4受容体を介したGタンパク質の活性化ならびにCXCR4リガンドおよび515H7 Mabによるその調節をモニタリングすることができる。

【0399】

CHO-K1についての上記実施例と同様にして、野生型CXCR4受容体を安定的且つ構成的に発現するNIH-3T3細胞を得た。完全培養培地 [10% FCS、1% L-グルタミン、2μ重炭酸ナトリウムを添加したEMEM] 中でHeLa (ヒト子宮頸癌) 細胞を増殖させた。溶解バッファー [Hepes 20mM、pH 7.4、NaCl 150mM] 中で機械的に破碎し、更に遠心 (1000g、15分間) して得られた細胞膜上で $[^3\text{S}]$ GTPγS結合を行った。SPA法 (シンチレーション近接アッセイ、GEヘルスケア社) を用いて $[^3\text{S}]$ GTPγS (比活性: 1000Ci/mmol) の取込みおよび検出を行った。簡潔に述べると、細胞膜 (10μg/ウェル) を、結合バッファー [Hepes 20mM、GDP 3μM、MgCl₂ 10mM、NaCl 100mM、EDTA 1mM、pH = 7.4] 中で、評価する化合物 (SDF-1または興味のあるMab)、 $[^3\text{S}]$ GTPγS (0.2~0.4nM) および最後にSPA-WGA-PVTビーズ (7.3mg/ウェル) と一緒にインキュベートした。結合反応は、25℃で1時間行った。遠心 [1000gで10分間] 後、シンチレーションカウンター (TopCount、パーキンエルマー社) を用いて放射線数を測定した。チェン・プルソフの等式:

$$K_B = [\text{アンタゴニスト濃度}] / \{ (EC_{50} \cdot / EC_{50}) - 1 \}$$

(式中、 EC_{50} および EC_{50} はそれぞれmAb非

84

存在下および存在下でのSDF-1の効力である) を用いてアンタゴニストの効力 (potency) を計算した。

【0400】

SDF-1は、CXCR4受容体によるGタンパク質活性化により、 $[^3\text{S}]$ GTPγS結合の用量依存的増加を誘導した。 $[^3\text{S}]$ GTPγS結合の最大刺激は、HeLaおよびNIH3T3/CXCR4細胞膜で、基底の $[^3\text{S}]$ GTPγS結合に対してそれぞれ167%および320%である。SDF-1の効力は、どちらの細胞系でも同様であり、 41.3 ± 9.7 nMに相当した (図4)。これらの実験条件下で、NIH3T3/CXCR4細胞中で決定された515H7 Mabのアンタゴニストとしての効力は15nMであった。HeLa細胞でも同様なアンタゴニストの効果が観察された (図5)。

【0401】

実施例6: CXCR4と種々の相互作用パートナーとの会合: 生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) 法による、ホモおよびヘテロ二量体化、βアレスチンのリクルートならびにこれらの二量体に対する515H7 Mabの影響

この機能的アッセイでは、CXCR4受容体へのSDF-1および/または515H7 Mabの結合によって誘導されるCXCR4ホモ二量体およびCXCR2/CXCR4ヘテロ二量体の形成レベルでのコンホメーション変化ならびにβアレスチン2シグナル伝達タンパク質のリクルートを評価することができる。

【0402】

従来の分子生物学的技術を用いて、調べる相互作用パートナーのそれぞれの発現ベクターを対応する色素 (ウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc) および黄色蛍光タンパク質 (YFP)) との融合タンパク質として構築した。BRET実験を行う2日前に、対応するBRETパートナーをコードする発現ベクターでHEK293細胞を一時的にトランスフェクトした: CXCR4ホモ二量体化の研究には $[CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP]$ 、CXCR4とCXCR2のヘテロ二量体化の研究には $[CXCR4/Rluc + CXCR2: YFP]$ 、CXCR4に仲介されるβアレスチン2のリクルートの研究には $[CXCR4/Rluc + \beta\text{-arr}2: YFP]$ 。翌日、ポリリジンで予めコーティングされた白色96MWプレートの完全培養培地 [10% FBSを添加したDMEM] 中に細胞を分注した。プレートに細胞を付着させるために、最初に細胞を5% CO₂、37℃で培養した。次いで、1ウェル当たり200μlのDMEMを用いて細胞を一晩飢餓状態にした。BRET実験直前に、DMEMを除き、すぐに細胞をPBSで洗浄した。次いで、抗体存在下または非存在下のPBS中で37℃にて10分間細胞をインキュベートし、その後、

85

300 nMのSDF-1とまたはSDF-1なしで、5 μ MのセレンテラジンHを添加して最終体積を50 μ lにした。37℃で更に10分間インキュベートした後、485 nmおよび530 nmでの発光取得(light-emission acquisition)を、Mithras LB940マルチラベルリーダー(ベルトールド社)を用いて開始した(1 s/波長/ウェルで、室温にて15回反復)。

【0403】

BRET比の計算は以前に記載されているように行った 10 (Angers et al., 2000) : $[(\text{発光}_{530\text{ nm}}) - (\text{発光}_{485\text{ nm}}) \times C_f] / (\text{発光}_{485\text{ nm}})$ 、式中、 C_f = 同じ実験条件下でRluc融合タンパク質のみを発現する細胞での $(\text{発光}_{530\text{ nm}}) / (\text{発光}_{485\text{ nm}})$ 。この等式を簡単にするにより、BRET比が、Rlucに融合したパートナーのみがアッセイ中に存在する時に同じ条件下で得られる比530/485 nmによって補正された、2つのBRETパートナーが存在する時に得られる比530/485 nmに相当することが示される。読み取り易いように、結果をミリBRE 20 T単位(mBU)で表す:mBUはBRET比に1000を掛けたものに相当する。

【0404】

SDF1 (300 nM) は、CXCR4受容体に融合したアダプタータンパク質とアクセプタータンパク質の空間的近接により生じるBRETシグナルを約20%増加させた。

このことは、CXCR4/CXCR4ホモ二量体の形成または予め存在する二量体のコンホメーション変化を示していると考えられる(図6A)。興味深いことに、S 30 DF1 (300 nM) は、CXCR2およびCXCR4に融合したアダプタータンパク質およびアクセプタータンパク質の空間的近接により生じるBRETシグナルを約24%減少させた。

このことは、CXCR2/CXCR4ヘテロ二量体の形成または予め存在する二量体のコンホメーション変化を示していると考えられる(図6B)。この後者の場合、SDF-1によって活性化されるCXCR4/CXCR2のコンホメーションはBRETエネルギー移動にあまり好ましくないようである。どちらの場合にも、515 40 H7 Mabは、SDF-1によって誘導されるCXCR4ホモ二量体のコンホメーション変化を調節することができ(SDF-1によって誘導されるBRETの増加を69%阻害、図6A)、また、CXCR2/CXCR4ヘテロ二量体形成のコンホメーション変化も調節することができた(515H7は、SDF-1によって誘導されるBRETの減少を90%阻害、図6B)。515H7 Mabは更に、単独で、CXCR4/CXCR4およびCXCR2/CXCR4の空間的近接をそれぞれ調節することができた。このことは、CXCR4/CX 50

86

CR4ホモ二量体およびCXCR2/CXCR4ヘテロ二量体のコンホメーションの両方に対する515H7 Mabの影響を示している(図6Aおよび6B)。

【0405】

SDF-1 (300 nM) によるCXCR4活性化により、233%のBRETシグナル増加によって示されるように、細胞内シグナル伝達分子 β アレスチンが強くリクルートされた(図6C)。このリクルートは515H7 Mabによって一部阻害され(約95%、図6C)、シグナル伝達に対するMab 515H7の影響が示された。

【0406】

実施例7: CXCR4によって仲介されるcAMP産生の阻害

この機能的アッセイは、阻害性Gi/oタンパク質を介してアデニル酸シクラーゼレベルでCXCR4受容体シグナル伝達をモニタリングするようにデザインした。

【0407】

cAMP LANCE法(パーキンエルマー社)を供給業者に説明されているように用いた。簡潔に述べると、前述したように、野生型CXCR4受容体を安定的且つ構成的に発現するNIH3T3細胞を得、増殖させた。トリプシンを含まない薬剤ベルセン(Versene)を用いて細胞を回収し、AlexaFluor結合抗cAMP Mab(100倍希釈)および化合物(フォルスコリン、SDF-1および/または515H7 Mab)を含む溶液中に 10^6 細胞/mlの濃度で再懸濁した。室温で30分間インキュベートした後、ユウロピウムストレプトアビジン(1/125希釈)複合体およびビオチン-cAMP(1/125希釈)複合体を含む検出液(detection mix)を添加した。室温で1時間インキュベートした後、得られたFRETシグナルを、Mithras LB940(ベルトールド社)マルチラベルリーダーで測定した。データは、任意の蛍光値としてまたはFKの影響を引いた後のSDF-1応答に対する相対刺激として表される。

【0408】

フォルスコリン(FK)は、NIH3T3/CXCR4細胞中で約0.3 μ Mの効力でcAMP産生を用量依存的に刺激した(図7A)。SDF-1共存在下では、CXCR4受容体による阻害性Gi/oタンパク質の活性化の結果として細胞内cAMPレベルが減少した。SDF-1の効力は、 5.0 ± 3.1 nMであった(図7A)。515H7 Mabは、フォルスコリンに刺激されるSDF-1(100 nM)の効果を80%超効率的に阻害した(図7B)。

【0409】

実施例8: Mab 515H7による、構成的活性型変異体Asn¹¹⁹Ser CXCR4受容体を発現する細胞膜での [³⁵S] GTP γ S結合の調節

87

この機能的アッセイでは、構成的活性型変異体 (CAM) Asn¹¹⁹Ser CXCR4 受容体を介した Gタンパク質活性化をモニタリングすることができる (Zhang et al., 2002 参照)。この高感度アッセイでは、CXCR4 リガンドをその固有の活性に基づいて識別することができる (部分アゴニスト、サイレントアンタゴニストまたはインバースアゴニスト)。Zhang らによって以前に報告されているように、AMD3100 または T140 等の CXCR4 リガンドは、CAM CXCR4 受容体でそれぞれ部分アゴニストおよびインバースアゴニストとして振る舞う。サイレントアンタゴニストの同定は、このクラスの分子が活性状態および不活性状態の両方の CXCR4 に対して同様な親和性を示さなければならないため、困難であり得る (Wurch et al., 1999)。

【0410】

従来の分子生物学的技術を用いて CXCR4 受容体のコード配列中に Asn119Ser の変異を導入した (QuickChange 部位特異的変異誘発キット、ストラタジーン社、米国)。上記実施例と同様にして、CAM CXCR4 受容体を安定的且つ構成的に発現する CHO-K1 細胞を得た。溶解バッファー [Hepes 20mM, pH7.4, NaCl 150mM] 中で機械的に破碎し、更に遠心 (10000g, 15分間) して得られた細胞膜上で、^[35S]GTPγS 結合を行った。^[35S]GTPγS (比活性: 1000Ci/mmol) の取込みは、SPA 法 (シンチレーション近接アッセイ、GEヘルスケア社) を用いて行った。簡潔に述べると、細胞膜 (10μg/ウェル) を、結合バッファー [Hepes 20mM, GDP 3μM, MgCl₂ 10mM, NaCl 100mM, EDTA 1mM, pH7.4] 中で、評価する化合物 (SDF-1 または Mab)、^[35S]GTPγS (0.2~0.4nM) および最後に SPA-WGA-PVT ビーズ (7.3mg/ウェル) と一緒にインキュベートした。結合反応は 25℃で1時間行った。遠心 [1000gで10分間] 後、シンチレーションカウンター (TopCount、パーキンエルマー社) で放射線数を測定した。

【0411】

SDF-1 (100nM) は、^[35S]GTPγS 結合を 130% 刺激した。インバースアゴニスト T140 は、基底の ^[35S]GTPγS 結合および SDF-1 刺激 ^[35S]GTPγS 結合の両方を阻害した (それぞれ -17% および -159%)。対照的に、515H7 Mab は、CAM CXCR4 でサイレントアンタゴニストとして振る舞い、基底の ^[35S]GTPγS 結合は変化させなかった (図8) が、SDF-1 誘導 ^[35S]GTPγS 結合は阻害した (図8)。

【0412】

実施例9: SDF-1 によって誘導される U937 細胞遊走に対する抗 CXCR4 Mab 515H7 の影響

88

遊走プロセスに対する抗 CXCR4 モノクローナル抗体 515H7 の阻害効果を評価するために、2% FCS を添加した RPMI 1640 培地中の 100000 個の U-937 細胞を遊走チャンバーの上側チャンバー (24 ウェルプレート、細孔径 8μm) にプレーティングし、ウェルの下部に SDF-1 が存在するものと存在しないもの、上側チャンバー中には Mab 515H7 が存在するものと存在しないものを用意した。この試験では、マウス IgG2b をアイソタイプ対照として導入した。プレーティングの2時間後に遊走細胞を数える。図9に示す結果から、予想された通り、SDF-1 が U-937 細胞遊走の有意な増加を誘導できることが示された。細胞を IgG2b アイソタイプ対照とインキュベートした時には影響は観察されなかった。一方、515H7 Mab とインキュベートした細胞では、80% を超える、SDF-1 誘導 U937 細胞遊走の有意且つ再現可能な減少が観察された。

【0413】

実施例10: 抗 CXCR4 Mab 515H7 による、Nod/Scid マウスにおける MDA-MB-231 異種移植腫瘍成長の阻害

これらの実験の目的は、抗 CXCR4 Mab 515H7 が Nod/SCID マウスにおける MDA-MB-231 異種移植片の成長を阻害する能力を評価することである。

【0414】

ECACC から入手した MDA-MB-231 細胞を DMEM 培地 (インビトロジェン社、英国スコットランド)、10% FCS (シグマ社、米国メリーランド州セントルイス) でルーチンに培養した。細胞が対数増殖期になるように、移植の48時間前に細胞を分割した。PBS 中の 1000 万個の MDA-MB-231 細胞を7週齢の Nod/Scid マウス (チャールス・リバー社、フランス) に移植した。移植の5日後に、腫瘍は測定可能であり ($34\text{mm}^3 < V^3 < 40\text{mm}^3$)、腫瘍のサイズが同等なマウス6頭の群にマウスを分けた。マウス1頭当たり2mgの負荷量の Mab 515H7 でマウスを腹腔内 (i. p.) 治療した。

【0415】

その後、0.5mg/用量 (dose) /マウスの Mab 515H7 を週2回、週3回、マウスに注射した。対照群として PBS 群をこの実験に含めた。腫瘍体積を週2回測定し、式: $\pi/6 \times \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ}$ によって計算した。マン・ホイットニー検定を用いて、各測定で統計解析を行った。

【0416】

これらの実験で、治療期間中に死亡は観察されなかった。PBS 群と比べて、0.5mg/用量の 515H7 で、D7 と D39 の間に腫瘍成長の有意な阻害があり ($p \leq 0.002$)、Mab 515H7 では治療5週間後

89

の平均腫瘍体積がPBSに対して50%減少していた（図10）。

【0417】

実施例11：CXCR4受容体に仲介される細胞内カルシウムストアの動員

この機能的アッセイは、小胞体の細胞内ストアからのカルシウムの遊離を誘導するホスホリパーゼC経路の刺激によるCXCR4受容体シグナル伝達をモニタリングするようにデザインした。

【0418】

上記実施例と同様にして、野生型CXCR4受容体を安定的且つ構成的に発現するCHO-K1細胞を得た。MDA-MB-231（ヒト乳がん）およびU937（ヒト白血病）細胞を、完全培養培地、それぞれ[10%FCSを添加したDMEM]および[10%FCS、20mM HEPES、1%非必須アミノ酸溶液、1%ピルビン酸ナトリウム、1%L-グルタミン、4.5g/l グルコースを添加したRPMI 1640]中で増殖させた。全ての種類の細胞を、100,000細胞/ウェルの密度で黒色96MWプレートの適切な培養培地中にプレATINGした。実験を行う前に細胞を一晩飢餓状態にした。細胞に、蛍光カルシウム色素（Fluo-4 No Wash、インビトロジェン社、米国）を含むローディングバッファー[HBSS 1×、HEPES 20mM、プロベニシド酸 25mM]を37℃で30分間、その後25℃で30分間ローディングした。各ウェルに直接注入することでSDF-1による刺激を行った。拮抗作用の実験では、SDF-1の少なくとも10分前に10μlのMab溶液をローディングバッファーに直接添加した。以下の設定で、マルチモード蛍光マイクロプレートリーダーMithras LB940（ベルトールド社）を用いて動的蛍光測定を行った：励起485nm、発光535nm、励起エネルギー10000任意単位。SDF-1注入の前20秒間にわたり、1秒毎に0.1秒間、各ウェルの蛍光を記録した（基底シグナル）。次いで、20μlのSDF-1を注入し、続いて、2分間にわたってデータを記録した。各実験条件は2連で（in duplicate）行った。基底の蛍光および細胞を含まない対照ウェルにより発せられた蛍光を引くことにより各ウェルの値を最初に補正する。SDF-1（100nM）によって得られた最大刺激に対するパーセンテージとして相対データを表した。

【0419】

SDF1（100nM）は組換えCHO/CXCR4において細胞内カルシウムの急速且つ強力な放出を誘導したが、ナイーブCHO-K1細胞では蛍光シグナルが検出されなかった。最大強度は基底の蛍光に対して160%超にまで達し、SDF-1刺激後約30秒で観察された。MDA-MB-231およびU-937の両方で、SDF-1（100nM）による最大蛍光強度は低め（

90

基底に対して130～140%）であるが、同様な動的曲線（kinetic curve）が観察された（図11A、11B、11C）。515H7抗体（133nM）は、調べた3つの細胞系の全てにおいて、SDF-1（100nM）によって誘導されるカルシウムシグナルを強力且つほとんど完全に阻害した。

【0420】

実施例12：U937マウス生存モデルにおける抗CXCR4 Mab 515H7の活性

ATCCから得たU937細胞をRPMI 1640培地、10%FCS、1%L-グルタミン中で培養した。細胞が対数増殖期にあるように、移植の2日前に細胞を分けた。

1000万個のU937細胞を雌のNOD/SCIDマウスに腹腔内注射した。移植の2日後、マウスを、2mgの515H7Mab/マウスの負荷量で、次いで1mgの抗体/マウスで週2回、皮下（s.c.）処置した。PBSを注射されたマウスとマウスIgGアイソタイプ対照を投与されたマウスの間で生存率に差が観察されないことが以前の研究で示されているので、対照マウスにはPBSを注射した。マウスの生存は毎日モニタリングした。

【0421】

図12の結果は、515H7 Mabで処置されたマウスで劇的且つ有意に寿命が増加し、515H7 MabではT/C%が約280であることを示している（図12）。

【0422】

実施例13：抗CXCR4 Mab 515H7による、Nod/ScidマウスにおけるT細胞KARPAS 299異種移植腫瘍成長の阻害

本実験の目的は、抗CXCR4 Mab 515H7がNod/ScidマウスにおけるKARPAS 299異種移植片の成長を阻害する能力を評価することである。

【0423】

ECACCから得たKARPAS 299細胞を、RPMI培地、1%L-Gluおよび10%FCS（シグマ社、米国メリーランド州セントルイス）中でルーチンに培養した。細胞が対数増殖期にあるように、移植の48時間前に細胞を分けた。PBS中の500万個のKARPAS 299細胞を7週齢のNod/Scidマウス（チャールス・リバー社、フランス）に移植した。移植の5日後、腫瘍は測定可能であり（ $32\text{mm}^3 < V^3 < 49\text{mm}^3$ ）、腫瘍のサイズが同等なマウス6頭の群にマウスを分けた。マウス1頭当たり2mgの負荷量のMab 515H7でマウスを腹腔内（i.p.）処置した。

【0424】

その後、1mg/用量（dose）/マウスのMab

91

515H7を週2回、マウスに注射した。対照群としてPBS群をこの実験に含めた。腫瘍体積を週2回測定し、式： $\pi/6 \times \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ}$ によって計算した。マン・ホイットニー検定を用いて、各測定で統計解析を行った。

【0425】

これらの実験で、処置期間中に死亡は観察されなかった。PBS群と比べて、1mg/用量の515H7 MabではD7とD33の間に腫瘍成長の有意な障害があり ($p \leq 0.002$)、処置5週間後の平均腫瘍体積がMab 515H7ではPBSに対して63%減少していた (図13)。

【0426】

実施例14：抗CXCR4キメラMab c515H7の産生

マウス515H7 Mabのキメラ形態をデザインした：これは、ヒトのC κ およびIgG1定常ドメインに遺伝的に融合させた目的のマウス抗体の軽鎖および重鎖の可変ドメインに相当する。HEK293/EBNAシステムとpCEP4発現ベクター (インビトロジェン社、米国) を用いた一過性のトランスフェクションによって組換えMabを産生した。

【0427】

515H7 Mab軽鎖および重鎖の可変ドメインに対応する全ヌクレオチド配列を網羅的遺伝子合成 (ジーンクラスト社 (Genecust)、ルクセンブルク) によって合成した。これらを、ヒトIgG1免疫グロブリンの軽鎖 (C κ) または重鎖 (CH1-ヒンジ-CH2-CH3) のいずれかの定常ドメインの全コード配列を有するpCEPベクター (インビトロジェン社、米国) にサブクローニングした。全てのクローニング工程は、実験マニュアル (Sambrook and Russel, 2001) に記載されているように従来の分子生物学的技術に従っておよび供給業者の取扱説明書に従って行った。各遺伝子コンストラクトを、Big Dye terminator cycle sequencing kit (アプライドバイオシステムズ社、米国) を用いたヌクレオチドシーケンシングで完全に検証し、3100 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ社、米国) を用いて分析した。

【0428】

懸濁液に適応させたHEK293 EBNA細胞 (インビトロジェン社、米国) を、オービタルシェーカーを用いて、6mMのグルタミンを添加した50mlの無血清培地Excell 293 (SAFCバイオサイエンス社) を入れた250mlフラスコ中でルーチンに成長させた (回転速度110rpm)。終濃度1mg/mlで水中に混合して調製した25kDaの線状ポリエチレンイミン (PEI) (ポリサイエンス社 (Polysciences)) およびプラスミドDNA (重鎖と軽鎖の

92

プラスミド比1:1で終濃度1.25 μ g/ml) を用いて、2.10⁶ 細胞/mlで一過性のトランスフェクションを行った。トランスフェクションの4時間後、等体積の新鮮な培養培地で培養液を希釈して最終細胞密度を10⁶ 細胞/mlとした。細胞生存率およびMab産生に基づいて培養プロセスをモニタリングした。典型的には、培養は4~5日間維持した。プロテインA樹脂 (GEヘルスケア社、米国) を用いた従来のクロマトグラフィー法でMabを精製した。

Mabは機能的評価に適したレベルで産生された。産生レベルは一般に、精製Mabで6~15mg/lである。

【0429】

実施例15：抗CXCR4キメラMab c515H7の結合特異性およびがん細胞系認識のFACS分析による特徴解析

本実験では、ヒトCXCR4への抗CXCR4キメラMab c515H7の特異的結合をFACS分析によって調べた。

【0430】

NIH3T3、NIH3T3-hCXCR4トランスフェクト細胞およびMDA-MB-231がん細胞系を、10 μ g/mLのモノクローナル抗体c515H7と一緒にインキュベートした。次いで、1%BSA/PBS/0.01%NaN₃で細胞を洗浄した。次に、Alexa標識二次抗体を細胞に添加し、4℃で20分間インキュベートした。次いで、細胞を再度2回洗浄した。2回目の洗浄後、FACS分析を行った。これらの結合実験の結果を以下の表7に示す。表は、抗CXCR4キメラMab c515H7がヒトCXCR4-NIH3T3トランスフェクト細胞系に特異的に結合し、ヒトがん細胞系、例えばMDA-MB-231乳癌細胞も認識すること [FACSで得られた平均蛍光強度 (MFI)] を示している。

【0431】

【表7】

表7

Mab (10 μ g/ml)	細胞のMFI	
	NIH3T3-CXCR4	MDA-MB-231
c515H7	2294	118

【0432】

実施例16：ヒトCXCR4受容体を安定的に発現するCHO-K1膜における抗CXCR4マウスMab m515H7およびキメラMab c515H7と [¹²⁵I] SDF-1の競合結合

このアッセイでは、オルソステリックまたはアロステリックな結合部位において、ヒトCXCR4受容体への放射標識 [¹²⁵I] SDF-1の結合に対してマウスMab m515H7およびキメラMab c515H7

93

が競合する能力を評価することができる。

【0433】

ヒトCXCR4受容体の全コード配列(参照配列NM_003467)を有する哺乳動物用発現ベクターでナイーブCHO-K1細胞(ATCC CCL-61)をトランスフェクションすることにより、ヒトCXCR4受容体を安定的且つ構成的に発現するCHO-K1細胞を得た。完全培養培地[5%ウシ胎児血清(FCS)および500μg/mlのジェネテシンを添加したDMEM-Ham's F12]中で細胞を増殖させた。溶解バッファ[**10** Hepes 20mM、pH7.4、NaCl 150mM]中でCHO/CXCR4細胞を機械的に破碎した後、遠心(10000g、15分間)して得られた細胞膜上で、放射性リガンド結合実験を行った。SPA法(シンチレーション近接アッセイ、GEヘルスケア社)を用いて $[^{125}\text{I}]$ SDF-1(比活性:1500Ci/mmol)の結合を行った。簡潔に述べると、細胞膜(30μg/ウェル)を、結合バッファ[Hepes 20mM、pH7.4、CaCl₂ 1mM、MgCl₂ 5mM、NaCl 150mM、BSA **20** 1%]中で、評価する化合物(SDF-1またはmAb)、放射性リガンド(1nM)および最後にSPA-WGA-PVTビーズ(7.3mg/ウェル)と一緒にインキュベートした。25℃で1時間後に結合平衡に達した。遠心[1000gで10分間]後、シンチレーションカウンタ(TopCount、パーキンエルマー社)を用いて放射線数を測定した。10μMの非標識SDF-1存在下で非特異的(NS)結合を推定した。

【0434】

抗CXCR4 Mab(100nM)は、 $[^{125}\text{I}]$ **30** SDF-1結合と効率的に競合し、競合効果($[^{125}\text{I}]$ SDF-1の阻害率)は以下の順番であった:m515H7(62±10%)およびc515H7(55±4%) (図14)。

【0435】

実施例17:抗CXCR4マウスMab m515H7およびキメラMab c515H7による、野生型CXCR4受容体を発現する細胞膜における $[^{35}\text{S}]$ GTPγS結合の調節

この機能的アッセイでは、野生型ヒトCXCR4受容体 **40** を介したGタンパク質の活性化ならびに抗CXCR4マウスMab m515H7およびキメラMab c515H7によるその調節をモニタリングすることができる。

【0436】

CHO-K1についての上記実施例と同様にして、野生型CXCR4受容体を安定的且つ構成的に発現するNIH-3T3細胞を得た。完全培養培地[10%FCS、1%L-グルタミン、2μM 重炭酸ナトリウムを添加したEMEM]中でHeLa(ヒト子宮頸癌)細胞を増 **50**

94

殖させた。溶解バッファ[Hepes 20mM、pH7.4、NaCl 150mM]中で機械的に破碎し、更に遠心(10000g、15分間)して得られた細胞膜上で、 $[^{35}\text{S}]$ GTPγS結合を行った。SPA法(シンチレーション近接アッセイ、GEヘルスケア社)を用いて $[^{35}\text{S}]$ GTPγS(比活性:1000Ci/mmol)の取込みおよび検出を行った。簡潔に述べると、細胞膜(10μg/ウェル)を、結合バッファ[Hepes 20mM、GDP 3μM、MgCl₂ 10mM、NaCl 100mM、EDTA 1mM、pH=7.4]中で、評価する化合物(SDF-1および興味のあるMab)、 $[^{35}\text{S}]$ GTPγS(0.2~0.4nM)および最後にSPA-WGA-PVTビーズ(7.3mg/ウェル)と一緒にインキュベートした。

結合反応は25℃で1時間行った。遠心[1000gで10分間]後、シンチレーションカウンタ(TopCount、パーキンエルマー社)を用いて放射線数を測定した。各MabについてIC₅₀を計算した。

【0437】

これらの実験条件下で、NIH3T3/CXCR4細胞中で決定されたm515H7 Mabおよびc515H7 MabのIC₅₀はそれぞれ1.9nMおよび1.5nMであった(図15)。同じ実験条件でHeLa細胞を用いて決定されたm515H7 Mabおよびc515H7 MabのIC₅₀はそれぞれ0.2nMおよび0.6nMであった(図16)。

【0438】

実施例18: CXCR4と種々の相互作用パートナーとの会合: 生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)法による、ホモおよびヘテロ二量体化、βアレスチンのリクルートならびにこれらの二量体に対するマウスMab m515H7およびキメラMab 515H7の影響
この機能的アッセイでは、CXCR4受容体へのSDF-1ならびに/またはm515H7マウスMabおよびc515H7キメラMabの結合によって誘導されるCXCR4ホモ二量体およびCXCR2/CXCR4ヘテロ二量体の形成レベルでのコンホメーション変化ならびにβアレスチン2シグナル伝達タンパク質のリクルートを評価することができる。

【0439】

調べる相互作用パートナーのそれぞれの発現ベクターを、従来の分子生物学的技術を用いて、対応する色素(ウミシイタケルシフェラーゼ(Rluc)および黄色蛍光タンパク質(YFP))との融合タンパク質として構築した。BRET実験を行う2日前に、対応するBRETパートナーをコードする発現ベクターでHEK293細胞を一時的にトランスフェクトした: CXCR4ホモ二量体化の研究には[CXCR4/Rluc+CXCR4/YFP]、CXCR4とCXCR2のヘテロ二量体化

95

の研究には [CXCR4-Rluc+CXCR2-YFP]、CXCR4に仲介されるβアレステチン2のリクルートの研究には [CXCR4-Rluc+β-arrestin2-YFP]。翌日、ポリリジンで予めコーティングされた白色96MWプレートの完全培養培地 [10% FBSを添加したDMEM] 中に細胞を分注した。プレートに細胞を付着させるために、最初に細胞を5% CO₂、37℃で培養した。次いで、1ウェル当たり200 μlのDMEMを用いて細胞を一晩飢餓状態にした。BRET実験直前に、DMEMを除き、すぐに細胞をPBSで洗

浄した。次いで、抗体存在下または非存在下のPBS中で37℃にて15分間細胞をインキュベートし、その後、100 nMのSDF-1とまたはSDF-1なしで、5 μMのセレンテラジンHを添加して最終体積を50 μlにした。37℃で5分間インキュベートし、ホモおよびヘテロ二量体でのみ室温で更に20分間インキュベートした後、485 nmおよび530 nmでの発光取得 (light-emission acquisition) を、Mithras LB940 マルチラベルリーダー (ベ

ルトールド社) を用いて開始した (1 s/波長/ウェルで、室温にて15回反復)。

【0440】
BRET比の計算は以前に記載されているように行った (Angers et al., 2000) : $[(\text{発光}_{530\text{nm}}) - (\text{発光}_{485\text{nm}}) \times C_f] / (\text{発光}_{485\text{nm}})$ 、式中、 C_f = 同じ実験条件下でRluc融合タンパク質のみを発現する細胞での $(\text{発光}_{530\text{nm}}) / (\text{発光}_{485\text{nm}})$ 。この等式を簡単にするにより、BRET比が、Rlucに融合したパートナーのみがアッセイ中に存在する時に同じ条件下で得られる比530/485 nmによって補正された、2つのBRETパートナーが存在する時に得られる比530/485 nmに相当することが示される。読み取り易いように、結果をミリBRET単位 (mBU) で表す: mBUはBRET比に1000を掛けたものに相当する。

【0441】

SDF1 (100 nM) は、CXCR4受容体に融合したドナータンパク質およびアクセプタータンパク質の空間的近接により生じるBRETシグナルを約10%増加させた。

このことは、CXCR4/CXCR4ホモ二量体の形成または予め存在する二量体のコンホメーション変化を示していると考えられる (図17A)。興味深いことに、SDF1 (100 nM) は、CXCR4およびCXCR2に融合したドナータンパク質およびアクセプタータンパク質の空間的近接により生じるBRETシグナルを約17%減少させた。このことは、CXCR2/CXCR4ヘテロ二量体の形成または予め存在する二量体のコンホメーション変化を示していると考えられる (図17B

96

)。この後者の場合、SDF-1によって活性化されるCXCR4/CXCR2のコンホメーションはBRETエネルギー移動にあまり好ましくないようである。どちらの場合にも、m515H7 Mabおよびc515H7 Mabは、SDF-1によって誘導されるCXCR4ホモ二量体のコンホメーション変化を調節することができ (c515H7は、SDF-1によって誘導されるBRETの増加を96%阻害。図17A)、また、CXCR2/CXCR4ヘテロ二量体形成のコンホメーション変化も調節することができた (c515H7は、SDF-1によって誘導されるBRETの減少を98%阻害。図17B)。m515H7 Mabおよびc515H7 Mabは更に、それらだけで、CXCR4/CXCR4およびCXCR2/CXCR4の空間的近接をそれぞれ調節することができた。このことは、CXCR4/CXCR4ホモ二量体およびCXCR2/CXCR4ヘテロ二量体のコンホメーションの両方に対するこれらのMabの影響を示している (図17Aおよび17B)。

【0442】

SDF-1 (100 nM) によるCXCR4活性化により、400%のBRETシグナル増加によって示されるように、細胞内シグナル伝達分子βアレステチンが強くリクルートされた (図17C)。このリクルートはc515H7 Mabによって一部阻害され (約93%、図17C)、シグナル伝達に対するこれらのMabの影響を示している。

【0443】

実施例19: CXCR4受容体に仲介される細胞内カルシウムストアの動員

この機能的アッセイは、小胞体の細胞内ストアからのカルシウムの遊離を誘導するホスホリパーゼC経路の刺激によるCXCR4受容体シグナル伝達をモニタリングするようにデザインした。

【0444】

上記実施例に記載したように、野生型CXCR4受容体を安定的且つ構成的に発現するCHO-K1細胞を得た。U937 (ヒト白血病) 細胞を、完全培養培地、それぞれ [10% FCSを添加したDMEM] および [10% FCS、20 mM HEPES、1% 非必須アミノ酸溶液、1% ビルビン酸ナトリウム、1% L-グルタミン、4.5 g/l グルコースを添加したRPMI 1640] 中で増殖させた。全ての種類の細胞を、100,000細胞/ウェルの密度で黒色96MWプレートの適切な培養培地中にプレーティングした。実験を行う前に細胞を一晩飢餓状態にした。細胞に、蛍光カルシウム色素 (Fluo-4 No Wash、インビトロジェン社、米国) を含むローディングバッファー [HBSS 1×、HEPES 20 mM、プロベニシド酸 25 mM] を37℃で30分間、その後25℃で30分間ローディングした。各ウェルに直接注入することでSDF

97

—1による刺激を行った。拮抗作用の実験では、SDF—1の少なくとも10分前に10 μ lのMab溶液をローディングバッファーに直接添加した。以下の設定で、マルチモード蛍光マイクロプレートリーダーMitthras LB940（ベルトールド社）を用いて動的蛍光測定を行った：励起485nm、発光535nm、励起エネルギー10000任意単位。SDF—1注入の前20秒間にわたり、1秒毎に0.1秒間、各ウェルの蛍光を記録した（基底シグナル）。次いで、20 μ lのSDF—1を注入し、続いて、2分間にわたってデータを記録した。各実験条件は2連で（in duplicate）行った。基底の蛍光および細胞を含まない対照ウェルにより発せられた蛍光を引くことにより各ウェルの値を最初に補正した。SDF—1（100nM）によって得られた最大刺激に対するパーセンテージとして相対データを表した。

【0445】

SDF1（100nM）は組換えCHO/CXCR4において細胞内カルシウムの急速且つ強力な放出を誘導したが、ナイーブCHO—K1細胞では蛍光シグナルが検出されなかった。最大強度は基底の蛍光に対して140%超にまで達し、SDF—1刺激後約40秒で観察された。U—937細胞でも同様な動的曲線（kinetic curve）が観察された（図18A、18B）。キメラ抗体c515H7（133nM）は、調べた両方の細胞系において、SDF—1（100nM）によって誘導されるカルシウムシグナルを強力且つほとんど完全に阻害した。

【0446】

実施例20：SDF—1によって誘導されるU937細胞遊走に対する抗CXCR4マウスMab m515H7およびキメラMab C515H7の影響

遊走プロセスに対する抗CXCR4 Mab m515H7およびc515H7の阻害効果を評価するために、2%FCSを添加したRPMI 1640培地中100000個のU—937細胞を遊走チャンバーの上側チャンバー（24ウェルプレート、細孔径8 μ m）にプレーティングし、ウェルの下部にSDF—1が存在するものと存在しないもの、上側チャンバー中にMab c515H7およびm515H7が存在するものと存在しないものを用意した。この試験では、マウスIgG2bをアイソタイプ対照として導入した。プレーティングの2時間後に遊走細胞を数えた。図19に示す結果から、予想されたように、SDF—1がU—937細胞遊走の有意な増加を誘導できることが示された。細胞をIgG2アイソタイプ対照とインキュベートした時には影響が観察されなかった。一方、c515H7 Mabおよびm515H7 Mabとインキュベートした細胞では、SDF—1誘導U937細胞遊走の有意且つ再現可能な減少が観察され、この減少はc515H7 MabおよびM

98

515H7 Mabでは約80%を超えた。

【0447】

実施例21：U937マウス生存モデルにおける抗CXCR4キメラMab c515H7の活性

ATCCから得たU937細胞をRPMI 1640培地、10%FCS、1%L—グルタミン中で培養した。細胞が対数増殖期にあるように、移植の2日前に細胞を分けた。

1000万個のU937細胞を雌のNOD/SCIDマウスに腹腔内（i. p.）注射した。移植の2日後、マウスを、2mgのc515H7 Mab/マウスの負荷量で、次いで1mgの抗体/マウスで週2回、皮下（s. c.）処置した。PBSを注射されたマウスとマウスIgGアイソタイプ対照を投与されたマウスの間で生存率に差が観察されないことが以前の研究で示されているので、対照マウスにはPBSを注射した。マウスの生存は毎日モニタリングした。

【0448】

図20に示す結果は、c515H7 Mabで処置されたマウスで劇的且つ有意に寿命が増加し、T/C%が約180であることを示している。

【0449】

実施例22：抗CXCR4マウス抗体515H7のヒト化

一般の手順

CDR移植の包括的規則を適用して515H7抗CXCR4抗体のヒト化を行った。IMGTの固有なナンバリングスキームならびにIMGTのライブラリーおよびツール（Lefranc, 1997 - www.imgt.org）を応用して、CDRおよびフレームワーク（FR）領域の免疫遺伝学的分析および決定を行った。

【0450】

SDF—1に仲介される β アレスチンのリクルートを阻害する能力について、操作された（engineered）抗体の機能的活性を生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）アッセイで試験することにより、ヒト化プロセスの効率を評価した。このアッセイでは、CXCR4をルシフェラーゼでタグ化し、 β アレスチンをYFPでタグ化した。SDF—1に仲介されるCXCR4への β アレスチンのリクルートはCXCR4のシグナル伝達における重要な工程である。ヒトCXCR4で安定にトランスフェクトされたNIH3T3細胞系を用いて515H7のヒト化バリエーションの結合も決定した。ビオチン化マウス抗体との競合アッセイを用いて結合活性を評価した。第2の試みとして、RAMOS細胞へのビオチン化SDF—1の結合を阻害する能力について、ヒト化抗体を評価した。RAMOS細胞は、CXCR4を多く発現し、CXCR7およびSDF—1の発現が少ないので選択された。

【0451】

99

これらのアッセイを用いて、抗CXCR4抗体の組換えヒト化バージョンの特徴解析を行った。可変ドメインをヒトIgG1/k定常ドメインと構成し、哺乳動物用発現ベクターpCEPにクローニングした。組換えIgG1/k由来抗体をHEK293細胞中で一時的に発現させた。発現培養上清をろ過し、プロテインAセファロースを用いて抗体を精製した。精製抗体をPBSバッファ中に再度懸濁し、ELISAで抗体濃度を求めた。

【0452】

515H7可変ドメインのヒト化

CDR移植に好適なヒト生殖系列を選択するために、マウスの515H7 VH配列との相同性が最も高いヒト生殖系列遺伝子を同定した。IMGTのデータベースおよびツールを利用して、マウス515H7 VH CDRのヒトアクセプター配列としてヒトIGHV3-49*04生殖系列遺伝子およびヒトIGHJ4*01 J生殖系列遺伝子を選択した。ヒトV遺伝子IGHV3-49*04は、マウス515H7重鎖可変ドメインのV遺伝子に80.27%の相同性を有する。ヒトJ遺伝子IGHJ4*01 Jの相同性は87.50%である。20
選択されたヒト生殖系列遺伝子とマウス抗体515H7のVHドメインは、19残基異なる。元の抗体のVHドメインと生殖系列配列とのアラインメントを図21に示す。

【0453】

軽鎖可変ドメインに関しては、ヒト生殖系列遺伝子IGKV4-1*01およびIGKJ1*01を選択した（図22）。ヒトV遺伝子IGKV4-1*01との相同性は79.12%である。軽鎖の515H7 J遺伝子はヒトJ遺伝子IGKJ1*01に対して84.85% 30
の相同性を有する。

【0454】

翻訳されたヒト生殖系列遺伝子IGHV3-49*04およびIGKV4-1*01のアミノ酸配列を用いて、結晶化のなされている相同な抗体を同定した。重鎖では、RCSB Protein Data Bankのアクセッション番号1MAMの抗体をモデルとして選び、軽鎖では、抗体1SBSを選んだ。コンピュータープログラムDS visualを用いて2つのドメインを構築し、ヒト化抗体515H7のモデルとして用いた。 40

【0455】

元の抗体と対応するヒト生殖系列配列との間で異なる各残基の位置に基づいて、ヒトとマウスの配列間で異なる各残基に優先順位（priority rank order）を付与した（図21および22）。これらの優先度を用いて、各ヒト化可変ドメインの3つの異なるバリエーションを作出し、それぞれVH1、VH2およびVH3と命名した。

【0456】

最初の一連の実験で、本発明者らは、3つの最初のヒト 50

100

化バリエーションを構築し、その抗CXCR4結合活性を分析した。VHバリエーション1（VH1）をマウスVLと組み合わせ、これらのコンストラクトを、ビオチン化した元のマウス515H7抗体の結合を阻害する能力について評価した。全てのコンストラクトで、マウス抗体との競合能は同程度であった（図23A~C）。このことは、最もヒトに近いVHバリエーションがそれほどヒトに近くないバリエーションと同じ結合能力を有することを示している。そこで、VH1を、VLの3つの異なるバリエーションと組み合わせた（図23D~F）。VH1とVL3の組み合わせだけが、ビオチン化マウス抗体と競合する能力の低下を示し、一方、フレームワーク中に逆変位を有さない最もヒトに近いバリエーションVH1 VL1はキメラ抗体と同じ交差ブロック活性を示した。

【0457】

このバリエーションVH1 VL1を更に、SDF-1に仲介されるβアレスチンのリクルートを阻害する能力についてBRETアッセイで調べた（図24）。元の抗体の交差ブロックにより決定された望ましい受容体結合活性にも関わらず、コンストラクトVH1 VL1はβアレスチンのリクルートの弱い阻害しか示さなかった。この強力な阻害活性の欠如のため、マウス残基でヒトフレームワーク残基を置換する必要がある。VH1に1つの逆変異を入れた。以下の残基を置換した：V48L、E61D、D76NおよびA81L（アミノ酸一次配列に基づいたナンバリング）。バリエーションVH1のこれらの逆変異1つの変異体をバリエーションVL1と組み合わせた。これらのうち、逆変異D76Nでのみ、BRETアッセイによる評価で、シグナル伝達の阻害が増加した（図25B）。

【0458】

このコンストラクトの活性を上昇させ、更に他の残基の重要性を評価するために、VH1について種々の二重逆変異の変異体を構築した。これらのコンストラクトの阻害活性はわずかに向上した（平均約45~50%の阻害）が、十分ではなかった（図25C）。次に、逆変異が1つの変異体D76Nを3つの異なるVLバリエーションと組み合わせた（図25D）。コンストラクトhz515H7 VH D76N VL2は、キメラ抗体と同じ範囲である平均88.2%の活性を示した。

【0459】

バリエーションVL1ドメイン中に一重および二重逆変異を構築し、コンストラクトhz515H7 VH1 D76N VL2の活性と比較した（図26）。調べた組合せのいずれも、このコンストラクトと同様なまたはこれより優れた活性を有さなかった。

【0460】

hz515H7 VH1 D76N VL2のフレームワーク中のヒト残基のパーセンテージを計算した：180残基中14個の非ヒト残基を含み、これは92.2%

101

の<germinality index>に等しい。比較として、市販のヒト化抗体ベバシズマブおよびトラスズマブはその可変ドメイン中にそれぞれ30および14個の非ヒト残基を含む。

【0461】

SDF-1に仲介されるβアレスチンのリクルートを阻害する効果が最も強かった、最も良い4つのヒト化型を、ビオチン化SDF-1の結合を阻害する能力についても試験した(図27A)。SDF-1結合とβアレスチンリクルートの阻害は密接に相関していた。この相関は、SDF-1結合の阻害がシグナル伝達阻害の主要な機構である可能性が最も高いことを示している。

【0462】

hz515H7 VH1 D76N VL2バリエーションを更にヒト化するために、図26で評価した二重および三重変異体で得られた情報を用いて、更に3つのバリエーションをデザインした。バリエーションVL2.1、VL2.2およびVL2.3(VL2-1、VL2-2およびVL2-3とも呼ぶ)中でそれぞれ更に4および5個の残基をヒト化した。これらは残基D9、P49、D66、S69、S83、L84;V89に相当する。VL2と比較したこれら3つのバリエーションのアラインメントを図28に示す。

【0463】

これらのVL2バリエーションがSDF-1によって仲介されるβアレスチンのリクルートを阻害する能力を評価した。ヒト化hz515H7 VH1 D76N VL2、VL2.1、VL2.2およびVL2.3バリエーションはキメラ抗体c515H7と同様な活性を示した(図26)。

【0464】

515H7-2可変ドメインのヒト化別のヒト化型を作製するために、軽鎖および重鎖の可変ドメインの両方についてCDR移植に別の好適なヒト生殖系列を選択した。これらの両方について、マウス配列との相関性のパーセンテージに関してだけでなく、それらがそれぞれマウス515H7のVLおよびVHと同じCDR長を有するように、生殖系列を選択した。

【0465】

IMGTのデータベースおよびツールを用いて、ヒトIGHV3-73*01生殖系列遺伝子およびヒトIGHJ4*01J生殖系列遺伝子を、マウス515H7 VH CDRのヒトアクセプター配列として選択した。ヒトV遺伝子IGHV3-73*01は、マウス515H7重鎖可変ドメインのV遺伝子に対して79%を超える相関性を有する。ヒトJ遺伝子IGHJ4*01Jに対する相関性は87.50%である。

【0466】

軽鎖可変ドメインに関して、ヒト生殖系列遺伝子IGKV2D-40*01およびIGKJ1*01を選択した

102

。ヒトV遺伝子IGKV2D-40*01との相関性は70%を超える。軽鎖の515H7のJ遺伝子はヒトJ遺伝子IGKJ1*01に対して84.85%の相関性を有する。

【0467】

元の抗体と対応するヒト生殖系列の配列間で異なる各残基の位置および当業者の知識に基づいて、逆変異する残基として複数の重要な残基を特定した。

【0468】

重鎖に関して、これらの残基はH35S、V48L、R50F、A61D、D76Nおよび/またはA81Lである(表2cの配列番号86および90参照)。

【0469】

軽鎖に関して、これらの残基はL9S、I21M、D40A、L43Q、Y59A、A61D、D66A、S69T、G74E、D76Yおよび/またはV89Lである(表2cの配列番号85および89参照)。

【0470】

実施例23:抗CXCR4ヒト化Mab 515H7の結合特異性およびがん細胞系認識のFACS分析による特徴解析

この実験では、抗CXCR4ヒト化Mab 515H7のヒトCXCR4への特異的結合をFACS分析により調べた。

【0471】

NIH3T3、NIH3T3-hCXCR4トランスフェクト細胞およびRamos、U937がん細胞系を、0~10μg/mLのヒト化Mab 515H7(hz515H7 VH1 D76N VL2 [=hz515H7VL2]、hz515H7 VH1 D76N VL2.1 [=hz515H7VL2.1]、hz515H7 VH1 D76N VL2.2 [=hz515H7VL2.2]およびhz515H7 VH1 D76N VL2.3 [=hz515H7VL2.3])と一緒に、4℃、暗黒下、100μlのFacsバッファー中で20分間インキュベートした。Facsバッファーで3回洗浄した後、細胞を二次抗体のヤギ抗ヒトAlexa488(1/500希釈)と一緒に、4℃、暗黒化で20分間インキュベートした。Facsバッファーで3回洗浄した後、各ウェルにヨウ化プロピジウムを添加し、生細胞のみをFacsで分析した。各条件について蛍光強度の平均値を評価するために少なくとも5000個の生細胞を評価した。

【0472】

これらの結合実験の結果を図29A~29Cに示す。これらは、抗CXCR4ヒト化Mab hz515H7が、ヒトCXCR4-NIH3T3トランスフェクト細胞系に特異的に結合すること(図29A)(元のNIH3T3細胞ではMFI=2.2)ならびにヒトがん細胞系、例えばU937(図29B)およびRamos(図2

50

103

9C)も認識すること〔FACSで得られた平均蛍光強度(MFI)〕を示している。

【0473】

実施例24：抗CXCR4ヒト化Mab 515H7による、野生型CXCR4受容体を発現する細胞膜における $[^3\text{H}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合の調節

この機能的アッセイでは、野生型ヒトCXCR4受容体を介したGタンパク質の活性化および抗CXCR4ヒト化Mab 515H7によるその調節をモニタリングすることができる。

【0474】

CHO-K1細胞についての上記実施例と同様にして、野生型CXCR4受容体を安定的且つ構成的に発現するNIH-3T3細胞を得た。溶解バッファー〔Hepes 20mM、pH7.4、NaCl 150mM〕中で機械的に破碎し、更に遠心(10000g、15分間)して得られた細胞膜上で、 $[^3\text{H}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合を行った。SPA法(シンチレーション近接アッセイ、GEヘルスケア社)を用いて $[^3\text{H}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ (比活性：1000Ci/mmol)の取込みおよび検出を行なった。簡潔に述べると、細胞膜(10μg/ウェル)を、結合バッファー〔Hepes 20mM、GDP 3μM、MgCl₂ 10mM、NaCl 100mM、EDTA 1mM、pH=7.4〕中で、評価する化合物(SDF-1および興味のあるMab)、 $[^3\text{H}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ (0.2~0.4nM)および最後にSPA-WGA-PVTビーズ(7.3mg/ウェル)と一緒にインキュベートした。結合反応は25℃で1時間行なった。遠心〔1000gで10分間〕後、シンチレーションカウンター(TopCount、パーキンエルマー社)を用いて放射線数を測定した。各MabについてIC₅₀を計算した。

【0475】

これらの実験条件下で、NIH3T3/CXCR4細胞中で決定されたヒト化(hz)515H7 MabのIC₅₀は、hz515H7 VH1 D76N VL2 Mabが3.86nM(図30A)、hz515H7 VH1 D76N VL2-1 Mabが4.05nM(図30B)、hz515H7 VH1 D76N VL2-2 Mabが5.19nM(図30C)、hz515H7 VH1 D76N VL2-3 Mabが8.5nM(図30D)であった。

【0476】

hz515H7 Mabは、SDF-1(100nM)によって刺激される $[^3\text{H}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合も阻害することができ、阻害率は、hz515H7 VH1 D76N VL2 Mabが86%、hz515H7 VH1 D76N VL2-1 Mabが69%、hz515H7 VH1 D76N VL2-2 Mabが66%、hz515H7 VH1 D76N VL2-3

104

Mabが58%(図31)であった。

【0477】

実施例25：CXCR4と種々の相互作用パートナーとの会合：生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)法による、ホモおよびヘテロ二量体化、βアレステチンのリクルートならびにこれらの二量体に対するヒト化Mab 515H7の影響

この機能的アッセイでは、CXCR4受容体へのSDF-1および/または515H7ヒト化Mabの結合によって誘導されるCXCR4ホモ二量体およびCXCR2/CXCR4ヘテロ二量体の形成レベルでのコンホメーション変化ならびにβアレステチン2シグナル伝達タンパク質のリクルートを評価することができる。

【0478】

従来の分子生物学的技術を用いて、調べる相互作用パートナーのそれぞれの発現ベクターを対応する色素(ウミシイタケルシフェラーゼ(Rluc)および黄色蛍光タンパク質(YFP))との融合タンパク質として構築した。BRET実験を行う2日前に、対応するBRETパートナーをコードする発現ベクターでHEK293細胞を一時的にトランスフェクトした：CXCR4ホモ二量体化の研究には〔CXCR4/Rluc+CXCR4/YFP〕、CXCR4とCXCR2のヘテロ二量体化の研究には〔CXCR4-Rluc+CXCR2-YFP〕、CXCR4に仲介されるβアレステチン2のリクルートの研究には〔CXCR4-Rluc+β-arrestin2-YFP〕。翌日、ポリリジンで予めコーティングされた白色96MWプレートの完全培養培地〔10%FBSを添加したDMEM〕中に細胞を分注した。プレートに細胞を附着させるために、最初に細胞を5%CO₂、37℃で培養した。次いで、1ウェル当たり200μlのDMEMを用いて細胞を一晩飢餓状態にした。BRET実験直前に、DMEMを除き、すぐに細胞をPBSで洗浄した。次いで、抗体存在下または非存在下のPBS中で37℃にて15分間細胞をインキュベートし、その後、100nMのSDF-1とまたはSDF-1なしで、5μMのセレンテラジンHを添加して最終体積を50μlにした。37℃で5分間インキュベートし、ホモおよびヘテロ二量体でのみ更に室温で20分間インキュベートした後、Mithras LB940マルチラベルリーダー(ベルトールド社)を用いて485nmおよび530nmでの発光取得を開始した(1s/波長/ウェルで、室温にて15回反復)。

【0479】

BRET比の計算は以前に記載されているように行なった(Angers et al., 2000)：〔(発光_{530nm}) - (発光_{485nm}) × Cf〕 / (発光_{485nm})、式中、Cf = 同じ実験条件下でRluc融合タンパク質のみを発現する細胞の(発光_{530nm}) / (発光_{485nm})。この等式を簡単にすることにより、BRET比が

105

、R1ucに融合したパートナーのみがアッセイ中に存在する時に同じ条件下で得られる比530/485nmによって補正された、2つのBRETパートナーが存在する時に得られる比530/485nmに相当することが示される。読み取り易いように、結果をミリBRET単位(mBU)で表す:mBUはBRET比に1000を掛けたものに相当する。

【0480】

SDF1(100nM)は、CXCR4受容体に融合したドナータンパク質およびアクセプタータンパク質の空間的近接により生じるBRETシグナルを約12%増加させた。

このことは、CXCR4/CXCR4ホモ二量体の形成または予め存在する二量体のコンホメーション変化を示していると考えられる(図32A)。興味深いことに、SDF1(100nM)は、CXCR4およびCXCR2に融合したドナータンパク質およびアクセプタータンパク質の空間的近接により生じるBRETシグナルを約16%減少させた。このことは、CXCR2/CXCR4ヘテロ二量体の形成または予め存在する二量体のコンホメーション変化を示していると考えられる(図32B)。この後者の場合、SDF-1によって活性化されるCXCR4/CXCR2のコンホメーションはBRETエネルギー移動にあまり好ましくないようである。どちらの場合にも、515H7ヒト化Mabは、SDF-1によって誘導されるCXCR4ホモ二量体のコンホメーション変化を調節することができ、SDF-1によって誘導されるBRET増加の阻害率は、hz515H7 VH1D76N-VL2 Mabが約88%、hz515H7 VH1D76N-VL2.1 Mabが65%、hz515H7 VH1D76N-VL2.2 Mabが33%、hz515H7 VH1D76N-VL2.3 Mabが21%であり(図32A)、また、CXCR2/CXCR4ヘテロ二量体では、SDF-1によって誘導されるBRET減少の阻害率は、hz515H7 VH1D76N-VL2 Mabが約100%、hz515H7 VH1D76N-VL2.1 Mab、hz515H7 VH1D76N-VL2.2 Mabおよびhz515H7 VH1D76N-VL2.3 Mabが50%であった(図32B)。515H7ヒト化Mabは更に、それらだけで、それぞれCXCR4/CXCR4およびCXCR2/CXCR4の空間的近接を調節することができた。このことは、CXCR4/CXCR4ホモ二量体およびCXCR2/CXCR4ヘテロ二量体のコンホメーションの両方に対するこれらのMabの影響を示している(図32Aおよび32B)。

【0481】

SDF-1(100nM)によるCXCR4活性化により、390%のBRETシグナル増加によって示されるように、細胞内シグナル伝達分子βアレステンが強くリ

106

クルートされた(図32C)。このリクルートは515H7ヒト化Mabによって一部阻害され、阻害はhz515H7 VH1D76N-VL2 Mabで約94%、hz515H7 VH1D76N-VL2.1 Mabで81%、hz515H7 VH1D76N-VL2.2 Mabで82%、hz515H7 VH1D76N-VL2.3 Mabで71%であり(図32C)、シグナル伝達に対するこれらのMabの影響を示している。

【0482】

実施例26:免疫組織化学的研究(IHC)

切片を脱パラフィンし、再水和し、熱処理によるエピトープ賦活化(heat-induced epitope retrieval)のために予め98℃に温めたpH8のEDTA中に7分間置いた。トリス緩衝食塩水-0.05% tween 20(TBS-T)(ダコ社、S3006)で3回洗浄した後、5分間ペルオキシダーゼブロッキング試薬(ダコ社、K4007)を用いて内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。切片をTBS-Tで洗浄し、ブロッキング試薬(UltraV block-TA-125UB-ラビビジョン社(Lab Vision))中で5分間インキュベートした後、抗CXCR-4マウスモノクローナル抗体(50μg/ml、クローン515H7、ピエールファブル社(Pierre Fabre))または対照としてのマウスIgG1/κ(50μg/ml、X0931、ダコ社)と4℃で一晩インキュベートした。切片をTBS-Tで洗浄し、Envision Dual Linkと室温で1時間インキュベートした。褐色反応産物の発色にジアミノベンジジンを用いた(ダコ社、K3468)。スライドを対比染色のためにヘマトキシリンに4分間浸し(ダコ社、S3309)、PBSで洗浄した後、Faramount封入剤およびカバースリップ中にマウントした。この免疫組織化学的方法では、褐色反応産物が細胞膜の陽性染色に関連し、褐色反応産物の欠如が陰性染色および細胞膜が可視化されないことに関連する。

【0483】

抗CXCR4マウスモノクローナル抗体、クローン515H7により、様々な種類の腫瘍の細胞膜が異なるように染色された。515H7の抗腫瘍活性が示された2つの異種移植モデル、RAMOSおよびKARPAS299で行った染色を図33および34に示した。図33および34に示されているように、得られた染色は固定依存的である。実際、膜染色は組織をホルマリン固定した場合の方が弱く(図34aおよび34c)、Glyofixx(ホルマリンの代替物)を用いた場合に膜染色が有意に増加した(図33aおよび33c)。

【0484】

実施例27:ヒトCXCR4受容体を安定的に発現するCHO-K1膜における^[125I]SDF-1と抗C

107

XCR4ヒト化Mab 515H7の競合結合

このアッセイでは、オルソステリックまたはアロステリックな結合部位において、ヒトCXCR4受容体への放射標識 [^{125}I] SDF-1の結合に対してヒト化Mab 515H7が競合する能力を評価することができる。

【0485】

ヒトCXCR4受容体の全コード配列(参照配列NM_003467)を有する哺乳動物用発現ベクターでナイーブCHO-K1細胞(ATCC CCL-61)をトランスフェクションすることにより、ヒトCXCR4受容体を安定的且つ構成的に発現するCHO-K1細胞を得た。完全培養培地[5%ウシ胎児血清(FCS)および500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のジェネテシンを添加したDMEM-Ham's F12]中で細胞を増殖させた。溶解バッファー[Hepes 20mM、pH7.4、NaCl 150mM]中でCHO/CXCR4細胞を機械的に破碎した後、遠心(10000g、15分間)して得られた細胞膜上で、放射性リガンド結合実験を行った。
[^{125}I] SDF-1の結合(比活性:1500 Ci/mmole)は、SPA法(シンチレーション近接アッセイ、GEヘルスケア社)を用いて行った。簡潔に述べると、細胞膜(30 $\mu\text{g}/\text{ウェル}$)を、結合バッファー[Hepes 20mM、pH7.4、CaCl₂ 1mM、MgCl₂ 5mM、NaCl 150mM、BSA 1%]中で、評価する化合物(SDF-1またはmAb)、放射性リガンド(1nM)および最後にSPA-WGA-PVTビーズ(7.3mg/ウェル)と一緒にインキュベートした。25℃で1時間後に結合平衡に達した。遠心[10000gで10分間]後、シンチレーションカウンター(TopCount、パーキンエルマー社)を用いて放射線数を測定した。10 μM の非標識SDF-1存在下で非特異的(NS)結合を推定した。

【0486】

抗CXCR4 Mabは、[^{125}I] SDF-1結合と効率的に競合し、競合効果([^{125}I] SDF-1の阻害率)は以下の順番であった:hz515H7 VH1D76N VL2(77%)、hz515H7 VH1D76N VL2.1(68%)、hz515H7 VH1D76N VL2.2(61%)およびhz515H7 VH1D76N VL2.3(49%)(図35A)。

【0487】

H515H7 Mabは[^{125}I] SDF-1結合を用量依存的に阻害し、IC₅₀は、hz515H7 VH1D76N VL2 Mabが1.44nM(図35B)、hz515H7 VH1D76N VL2.1 Mabが6.69nM(図35C)、hz515H7 VH1D76N VL2.2 Mabが5.91nMであった(図35D)。

108

【0488】

実施例28: CXCR4受容体に仲介される細胞内カルシウムストアの動員

この機能的アッセイは、小胞体の細胞内ストアからのカルシウムの遊離を誘導するホスホリパーゼC経路の刺激によるCXCR4受容体シグナル伝達をモニタリングするようにデザインした。

【0489】

完全培養培地[10%FCS、20mM HEPES、1%非必須アミノ酸溶液、1%ピルビン酸ナトリウム、1%L-グルタミン、4.5g/l グルコースを添加したRPMI 1640]中でU937(ヒト白血病)細胞を増殖させた。細胞を100,000細胞/ウェルの密度で黒色96MWプレートの適切な培養培地中にプレーティングし、実験を行う前に一晚飢餓状態にした。細胞に、蛍光カルシウム色素(Fluo-4 No Wash、インビトロジェン社、米国)を含むローディングバッファー[HBSS 1×、HEPES 20mM、プロベニシド酸 25mM]を37℃で30分間、その後25℃で30分間ローディングした。各ウェルへの直接注入によりSDF-1による刺激を行った。拮抗作用の実験では、SDF-1の少なくとも10分前に10 μl のMab溶液をローディングバッファーに直接添加した。以下の設定で、マルチモード蛍光マイクロプレートリーダーMithras LB940(ベルトールド社)を用いて動的蛍光測定を行った:励起485nm、発光535nm、励起エネルギー10000任意単位。SDF-1注入の前20秒間にわたり、1秒毎に0.1秒間、各ウェルの蛍光を記録した(基底シグナル)。次いで、20 μl のSDF-1を注入し、続いて、2分間にわたってデータを記録した。各実験条件は2連で(in duplicate)行った。基底の蛍光および細胞含まない対照ウェルにより発せられた蛍光を引くことにより各ウェルの値を最初に補正する。SDF-1に(100nM)よって得られた最大刺激に対するパーセンテージとして相対データを表す。

【0490】

SDF1(100nM)はU937細胞中で細胞内カルシウムの急速且つ強力な放出を誘導した。最大強度は基底の蛍光に対して340%を超え、SDF-1による刺激後約40秒で観察された。hz515H7 VH1D76N VL2 Mab(133nM)は、U937細胞系においてSDF-1(100nM)によって誘導されるカルシウムシグナルを一部阻害した(図36、前記Mabはレジェンド中でhz515H7 VL2とだけ記載されている)。

【0491】

実施例29: SDF-1によって誘導されるU937細胞遊走に対する抗CXCR4ヒト化Mab hz515H7の影響

50

109

遊走プロセスに対する抗CXCR4ヒト化Mab hz 515H7 VH1D76N VL2 (hz 515H7 と呼ぶ) の阻害効果を評価するために、2% FBSを含むRPMI 1640培地中、37℃、5% CO₂ で、10 μg/mlの抗体と共にU937細胞を40分間インキュベートした。合計 5×10^4 個の細胞を上側のtranswellチャンパー (コーニング社、米国マサチューセッツ州ローウェル) に入れた。下側チャンパーには、2% FBSを含む培地を含めてSDF-1 (100 ng/ml) を添加した。細胞播種の2時間後にtranswellチャンパーから上側チャンパーに遊走した細胞数を数えることにより、U937細胞の遊走を測定した。ATPの定量化に基づいて培養液中の生細胞数を測定するCell Titer-Glo (登録商標) Luminescent Cell Viability Assayを用いて遊走した細胞を計数した。

【0492】

図37Aに示した結果から、予想された通り、SDF-1がU-937細胞遊走の有意な増加を誘導できることが実証された。細胞をIgG1アイソタイプ対照とインキュベートした時には影響は観察されなかった。一方、図37Aは、10 μg/mlのhz 515H7 VH1 D76N VL2 MabによるSDF1誘導U937細胞遊走の阻害を示している。結果は3連 (in triplicate) で行った3つの独立した実験の平均±SDを表している。

【0493】

図37Bは、SDF-1誘導細胞遊走に対する様々な量のhz 515H7 VH1 D76N VL2 Mabの効果を示す図である。結果は4つの独立した実験の平均±SEMを表している ($IC_{50} = 4.53 \times 10^{-3} \mu g/ml \pm 2.2 \times 10^{-3}$) 。

【0494】

実施例30: hz 515H7 VH1 D76N VL2を用いた免疫組織化学的研究 (IHC)

切片を脱パラフィンし、再水をし、熱処理によるエピトープ賦活化 (heat-induced epitope retrieval) のために予め98℃に温めたpH8のEDTA中に7分間置いた。トリス緩衝食塩水-0.05% tween 20 (TBS-T) (ダコ社、S3006) で3回洗浄した後、5分間ペルオキシダーゼブロッキング試薬 (ダコ社、K4007) を用いて内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。切片をTBS-Tで洗浄し、ブロッキング試薬 (Ultra V block-TA-125UB-ラビビジョン社) 中で5分間インキュベートした後、ビオチン化されたヒト化抗CXCR4抗体 (50 μg/ml、hz 515H7 VH1 D76N VL2、ピエールファール社) またはアイソタイプ対照としてのビオチン化されたヒトIgG1 (50 μg/ml、BP078、バインディング

110

・サイト社 (The Binding Site)) と4℃で一晩インキュベートした。切片をTBS-Tで洗浄し、ストレプトアビジンHRPと室温で1時間インキュベートした。褐色反応産物の発色にジアミノベンジン (ダコ社、K3468) を用いた。スライドを対比染色のためにヘマトキシリンに4分間浸し (ダコ社、S3309)、PBSで洗浄した後、Faramount 封入剤およびカバースリップ中にマウントした。この免疫組織化学的方法では、褐色反応産物が細胞膜の陽性染色に関連し、褐色反応産物の欠如が陰性染色および細胞膜が可視化されないことに関連する。

【0495】

ビオチン化抗CXCR4ヒト化抗体515H7 VH1 D76N VL2により、様々な種類の腫瘍の細胞膜が異なるように染色される。図38および39に、マウスを515H7で処置した時に抗腫瘍活性が示された2つの異種移植モデルRAMOSおよびKARPAS299で行った染色を示した。図38および39に示されているように、得られた染色は固定依存的である。実際、膜染色は組織をホルマリンで固定した場合の方が弱く (図39aおよび39c)、一方、Glyo-fixx (ホルマリンの代替物) を用いた場合に膜染色が有意に増加した (図38aおよび38c) 。

【0496】

実施例31: ScidマウスにおけるB細胞Ramos異種移植腫瘍成長に対するキメラ515H7 (c515H7)、ヒト化型hz 515H7 VH1D76N VL2およびhz 515H7 VH1 D76N VL2 . 1 Mabの影響

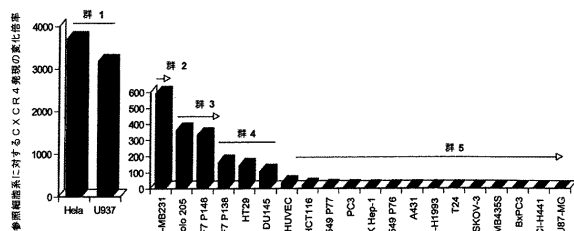
ATCCから入手したRamos細胞をRPMI 1640培地、10% FCSおよび2mM L-Glu (シグマ社、米国メリーランド州セントルイス) 中でルーチンに培養した。細胞が対数増殖期になるように、移植の48時間前に細胞を分けた。7週齢の雌SCIDマウス (チャールス・リバー社、フランス) にPBS中100万個のRamos細胞を皮下 (s.c.) 移植した。移植の5日後、腫瘍は測定可能であり (平均 $100 mm^3$)、腫瘍のサイズが同等なマウス6頭の群にマウスを分けた。マウス1頭当たり2mgの負荷量のMab c515H7、hz 515H7 VH1D76N VL2またはhz 515H7 VH1 D76N VL2. 1でマウスを腹腔内 (i.p.) 処置した。その後、1mg/用量/マウスのMab c515H7、hz 515H7 VH1 D76N VL2またはhz 515H7 VH1 D76N VL2. 1を週2回マウスに注射した。対照群としてPBS群をこの実験に含めた。腫瘍体積を週2回測定し、式: $\pi/6 \times \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ}$ によって計算した。マン・ホイットニー検定を用いて、各測定で統計解析を行った。

【0497】

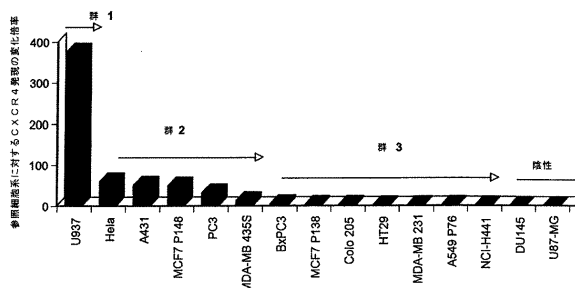
111

これらの実験で、処置期間中に死亡は観察されなかった。PBS群と比べて、1mg/用量のc 5 1 5 H 7 M a b (図40)、h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 M a b (図41) およびh z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2. 1 (図42) で、D 1 1 とD 5

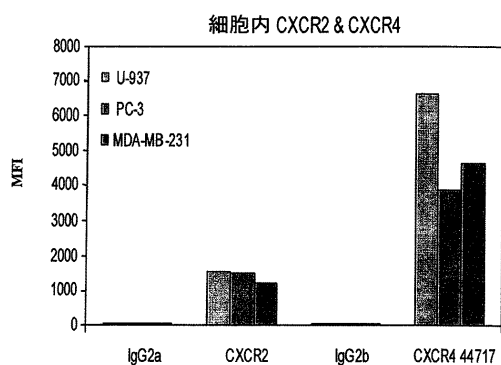
【図1 A】



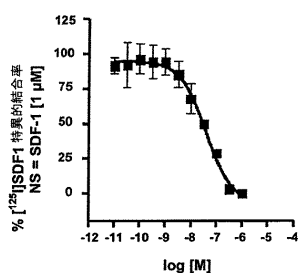
【図1 B】



【図2】



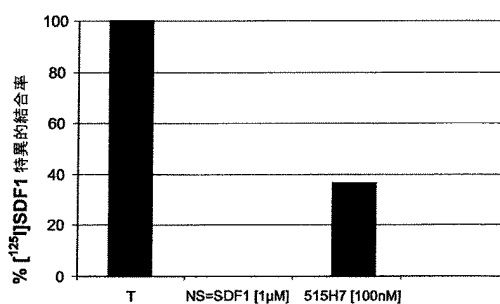
【図3 A】



112

4の間に腫瘍成長の有意な阻害があり、c 5 1 5 H 7 M a bおよびh z 5 1 5 H 7 M a bでは、処置されたマウスでPBS群と比べて処置4週間後の平均腫瘍体積が9 2 %減少していた。

【図3 B】



【図4】

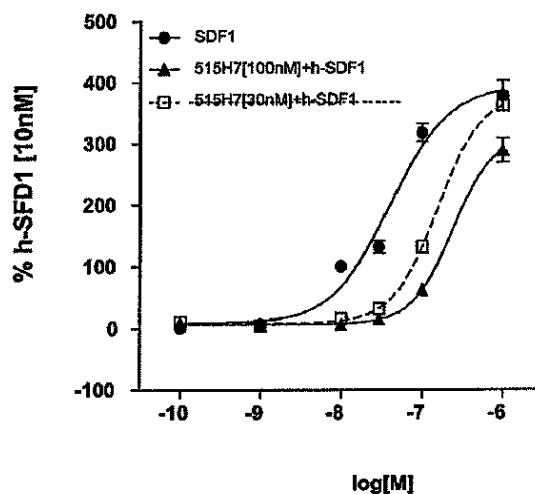
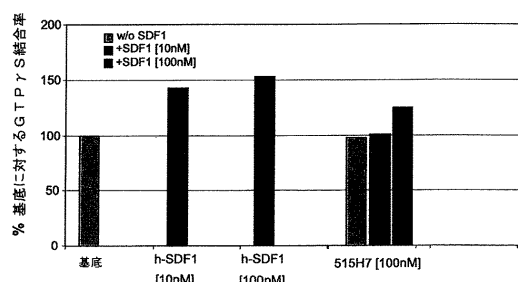
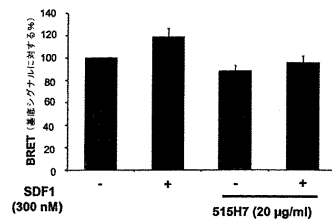


FIGURE 4

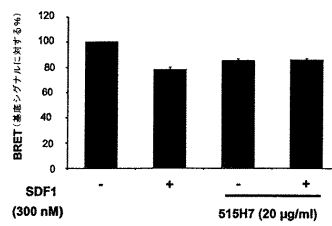
【図5】



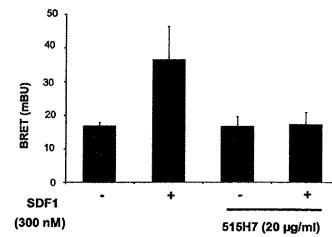
【図 6 A】



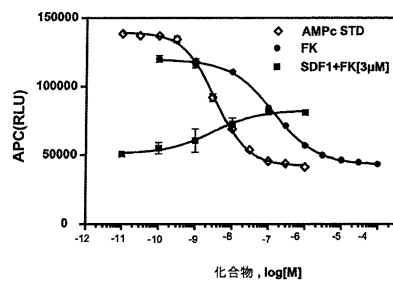
【図 6 B】



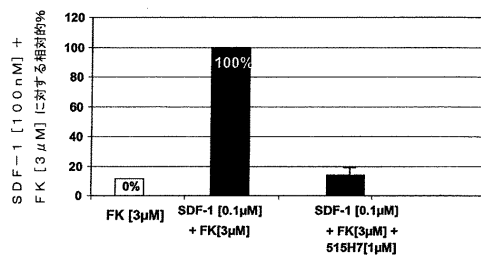
【図 6 C】



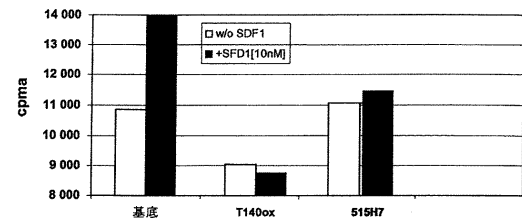
【図 7 A】



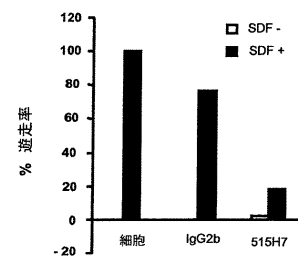
【図 7 B】



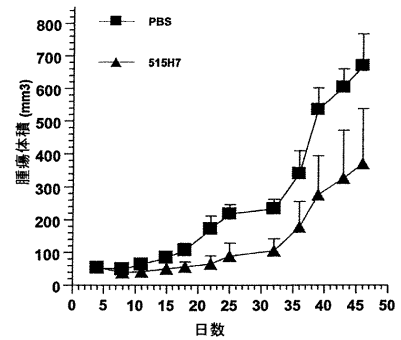
【図 8】



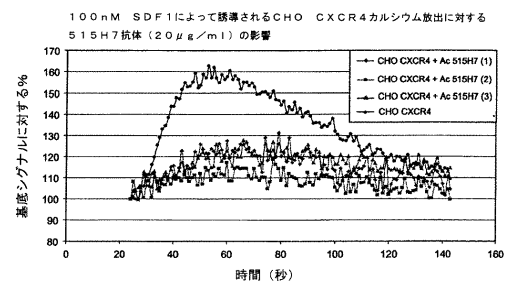
【図 9】



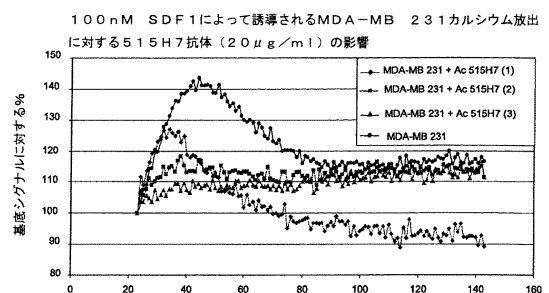
【図 10】



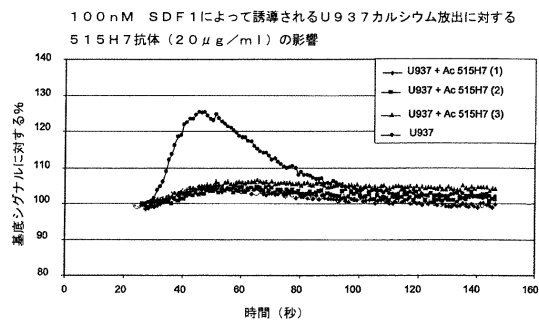
【図 11 A】



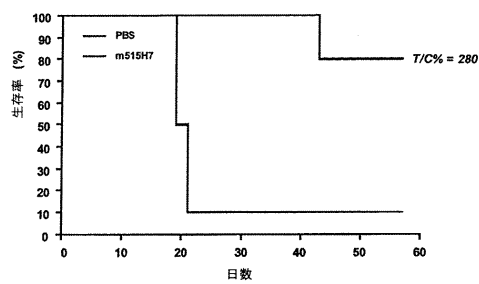
【図 11 B】



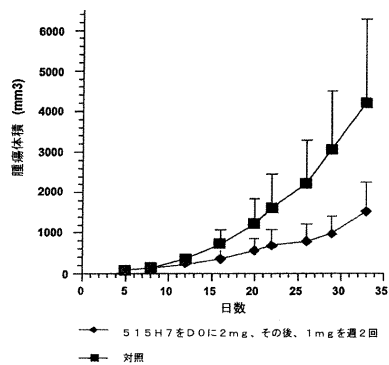
【図11C】



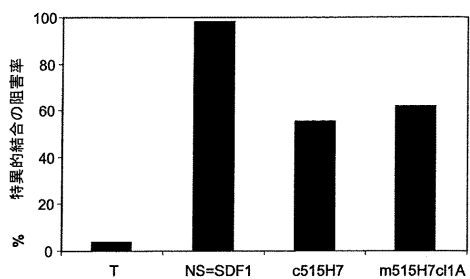
【図12】



【図13】



【図14】



【図15】

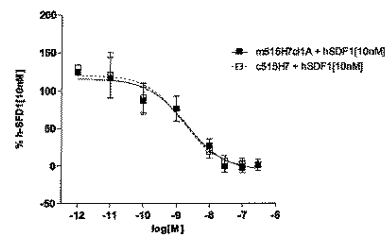


FIGURE 15

【図16】

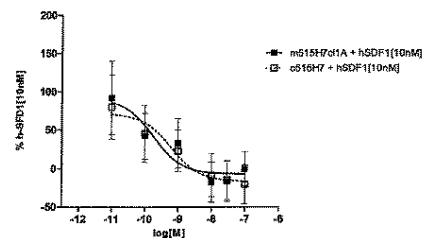
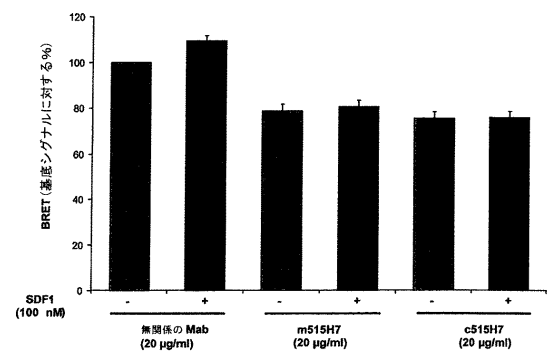
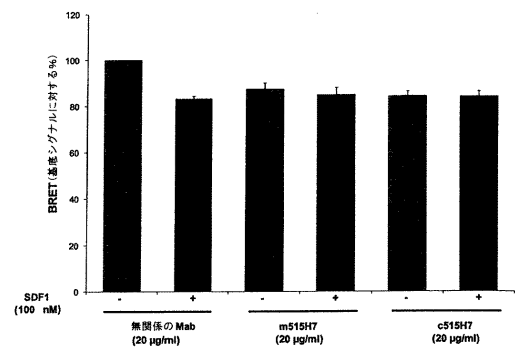


FIGURE 16

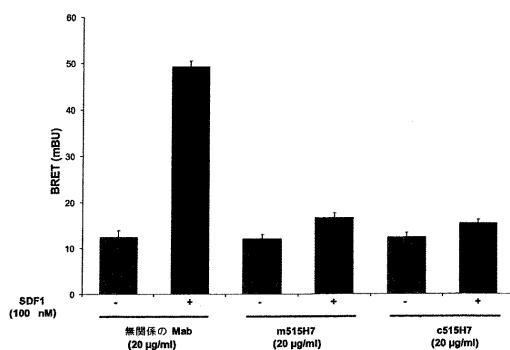
【図17A】



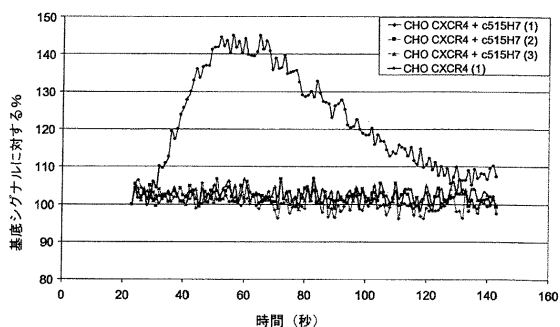
【図17B】



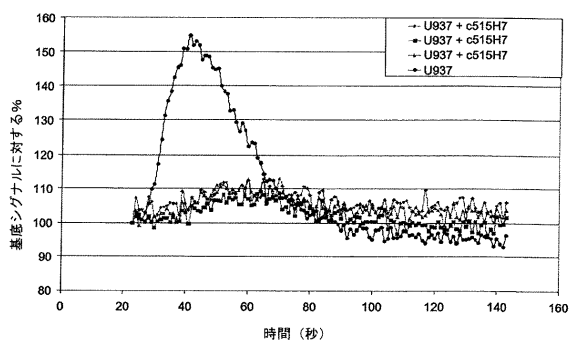
【図17C】



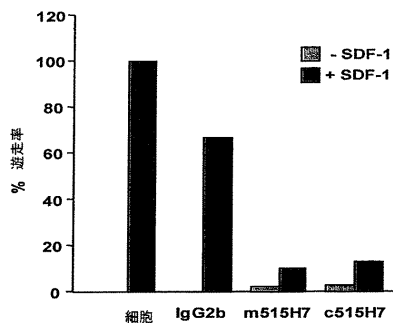
【図18A】



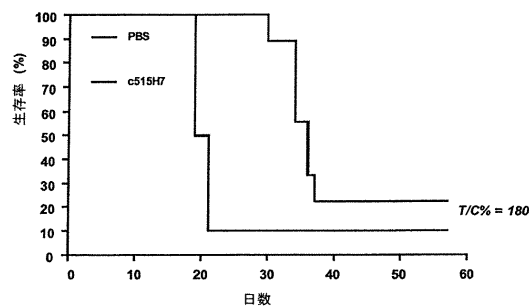
【図18B】



【図19】



【図20】



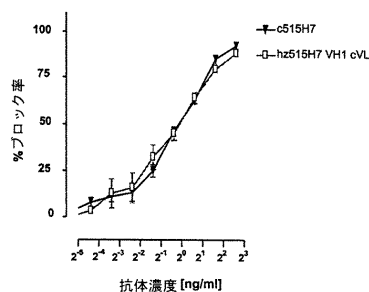
【図21】

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
515H7 VH IGHV3-49*04	1 10 20 30 40 50 60			
EVNLVESGG.GLVQPGGSLRLSCTAS GFTF...TDNY MSWVRQAPGKGLWVGIF IRNKANGYTT				
EVNLVESGG.GLVQPGGSLRLSCTAS GFTF...TDNY MSWVRQAPGKGLWVGIF IRNKANGYTT				
プライオリティ	2 3 33		3 3 1	
VH1 VH2				
EVNLVESGG.GLVQPGGSLRLSCTAS GFTF...TDNY MSWVRQAPGKGLWVGIF IRNKANGYTT				
EVNLVESGG.GLVQPGGSLRLSCTAS GFTF...TDNY MSWVRQAPGKGLWVGIF IRNKANGYTT				
FR3-IMGT (66-104)			CDR3-IMGT (105-115)	FR4-IMGT (116-125)
70 80 90 100				
DYSASVR.GRFTISRDDSKSIAYLQNNLSKTEDTAVVYC ARDVGSNFYFDYW GQGTLTVTSS				
EYASVK.GRFTISRDDSKSIAYLQNNLSKTEDTAVVYC TR				
D S R N Q L A R A S T YFDYW GQGTLTVTSS				
1 3 1 1 3 1 2 23 3 3 T				
プライオリティ				
VH1 VH2				
EYASVK.GRFTISRDDSKSIAYLQNNLSKTEDTAVVYC ARDVGSNFYFDYW GQGTLTVTSS				
DYSASVR.GRFTISRDDSKSIAYLQNNLSKTEDTAVVYC ARDVGSNFYFDYW GQGTLTVTSS				

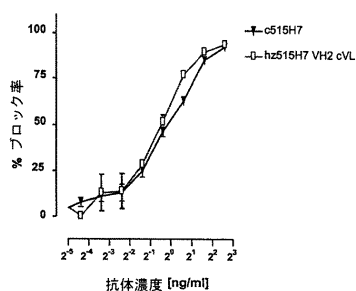
【図22】

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
515H7 VL IGKV4-1*01	1 10 20 30 40 50 60			
DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSS QSLFNSRTRNKY LAWYQKPGQPKLLIY WA.....S				
DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSS QSLFNSRTRNKY LAWYQKPGQPKLLIY WA.....S				
プライオリティ	3 2 3 33 22		5	
VL1 VL3 VL2				
DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSS QSLFNSRTRNKY LAWYQKPGQPKLLIY WA.....S				
DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSS QSLFNSRTRNKY LAWYQKPGQPKLLIY WA.....S				
DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSS QSLFNSRTRNKY LAWYQKPGQPKLLIY WA.....S				
FR3-IMGT (66-104)			CDR3-IMGT (106-113)	FR4-IMGT (114-123)
70 80 90 100				
ARDSGVP.ARFTEGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVVYC MQSFNLR FTQGTKEIK				
TRESGVP.DRFTEGSG..SGTDFLTISRVAEDLAVVYC WT FTQGTKEIK				
A D A T E Y R V L				
1 1 2 1 1 1 22 2				
プライオリティ				
VL1 VL3 VL2				
TRESGVP.DRFTEGSG..SGTDFLTISRVAEDLAVVYC MQSFNLR FTQGTKEIK				
ARDSGVP.DRFTEGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVVYC MQSFNLR FTQGTKEIK				
ARDSGVP.ARFTEGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVVYC MQSFNLR FTQGTKEIK				

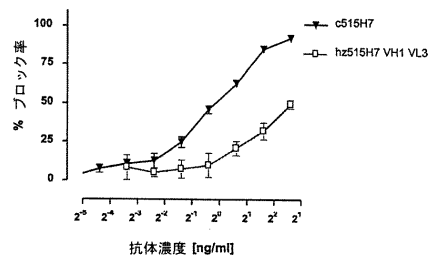
【図23A】



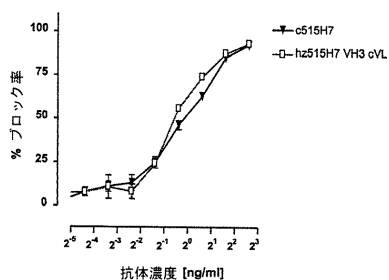
【図23B】



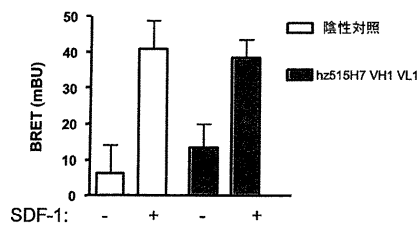
【図23F】



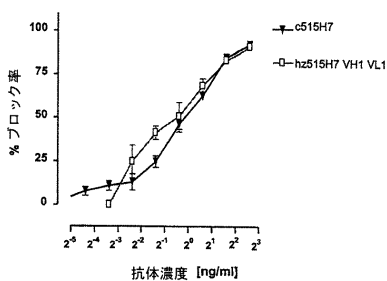
【図23C】



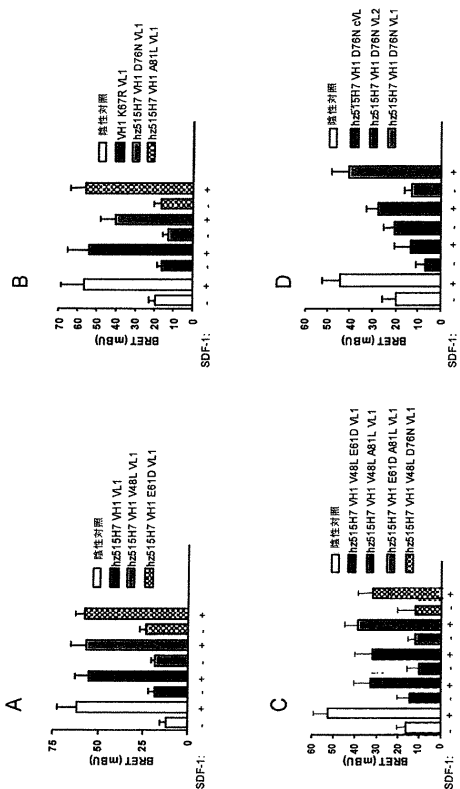
【図24】



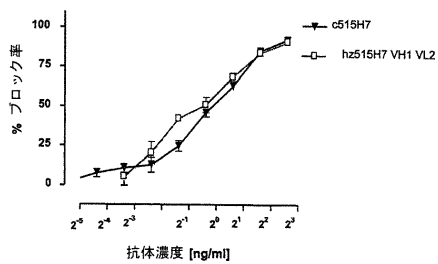
【図23D】



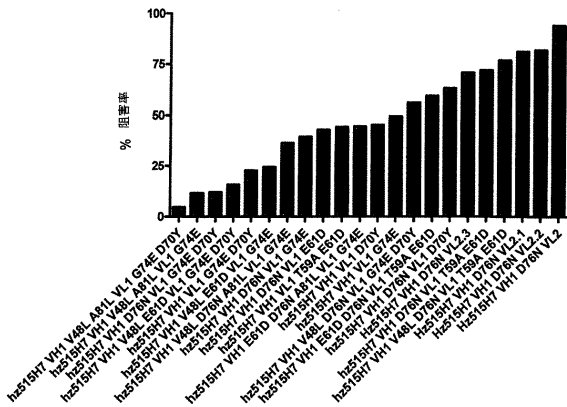
【図25】



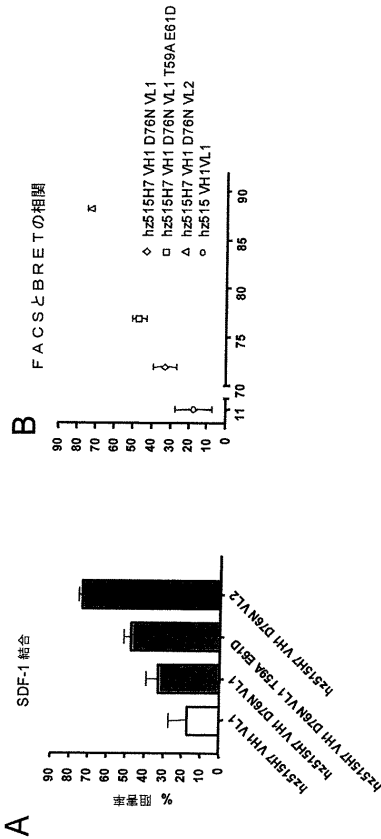
【図23E】



【図 29 A】



【図 27】



【図 28】

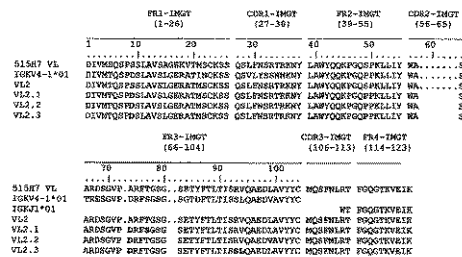
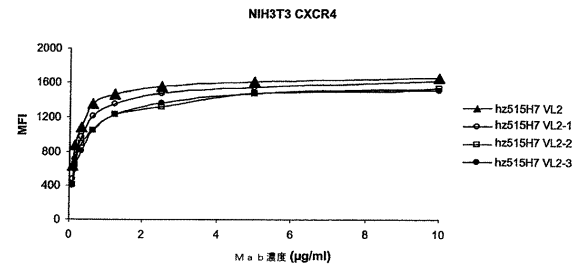
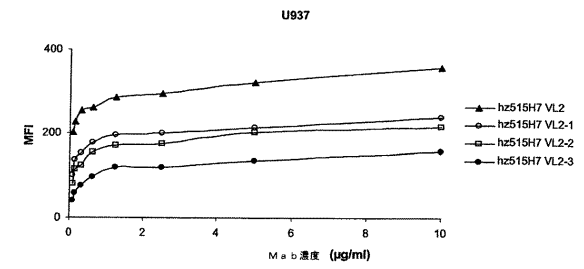


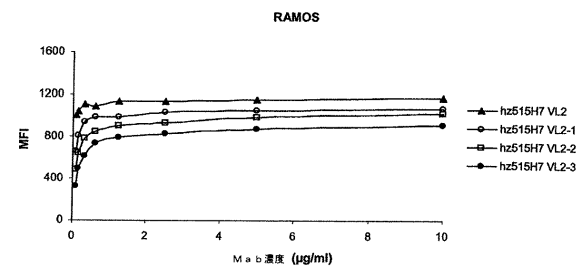
FIGURE 28



【図 29 B】



【図 29 C】



【図 30 A】

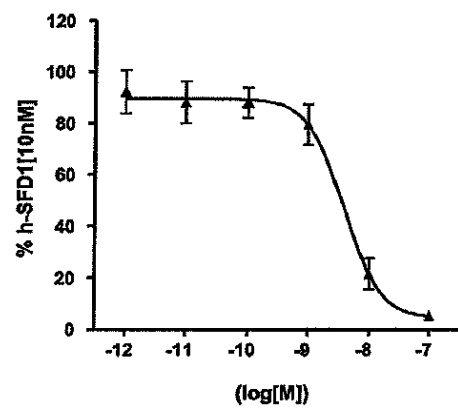


FIGURE 30A

【図30B】

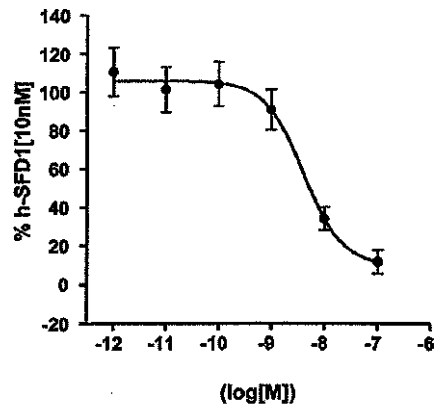


FIGURE 30B

【図30C】

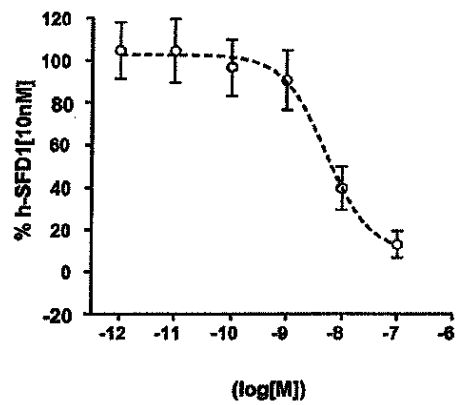


Figure 30C

【図30D】

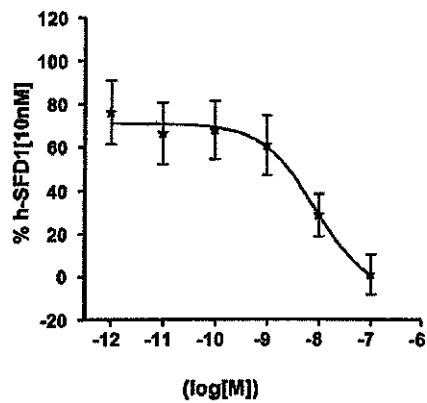
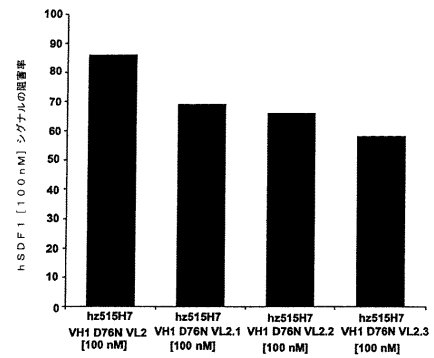
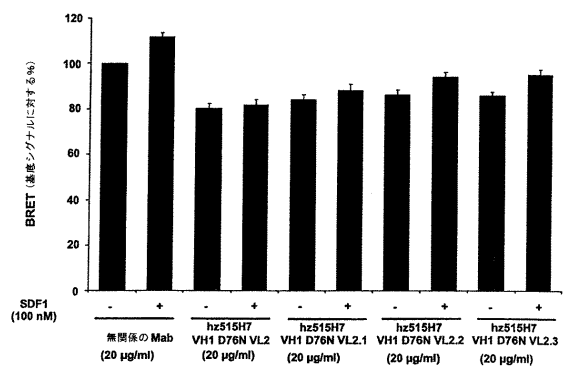


Figure 30D

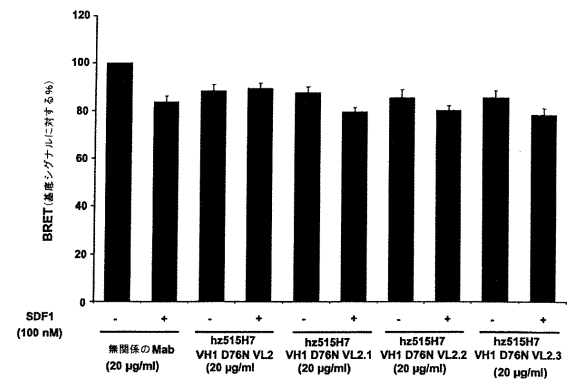
【図31】



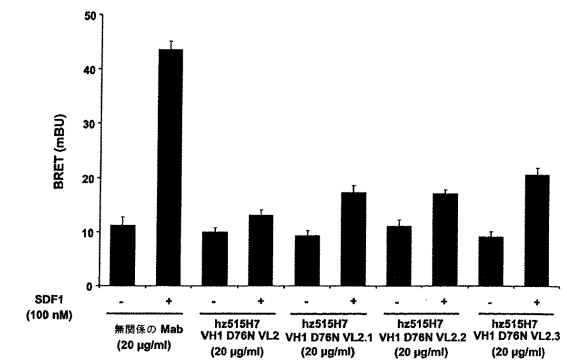
【図32A】



【図32B】



【図32C】



【図 3 3 A】

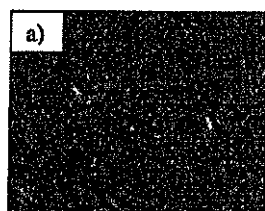


Figure 33A

【図 3 3 B】

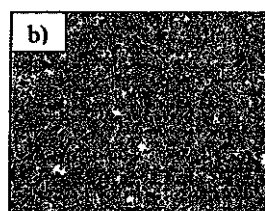


Figure 33B

【図 3 3 C】

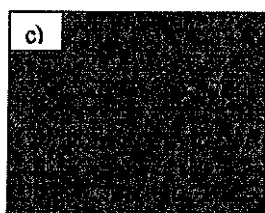


Figure 33C

【図 3 3 D】

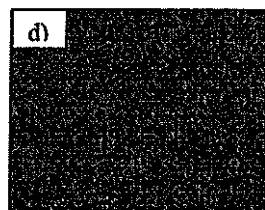


Figure 33D

【図 3 4 A】

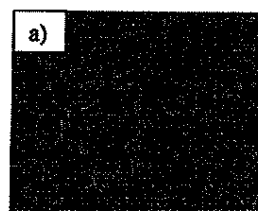


Figure 34A

【図 3 4 B】

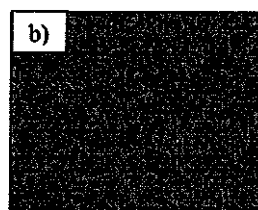


Figure 34B

【図 3 4 C】

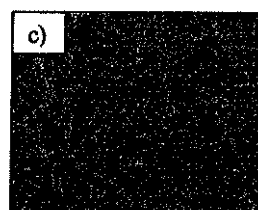


Figure 34C

【図 3 4 D】

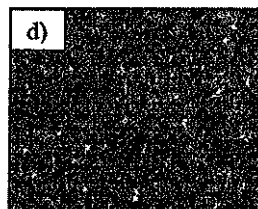
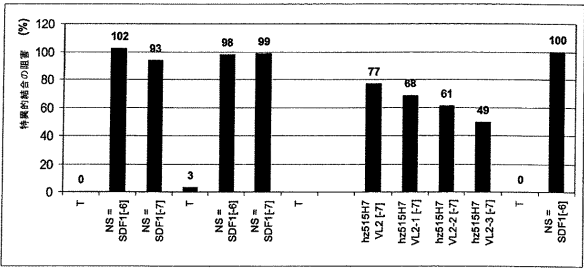
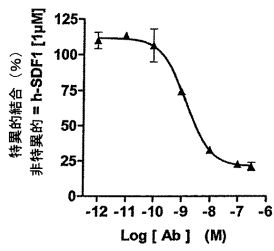


Figure 34D

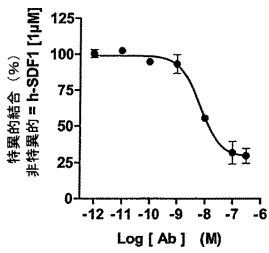
【図35A】



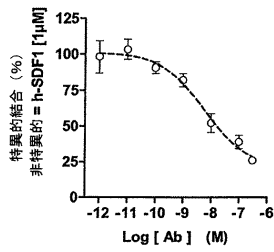
【図35B】



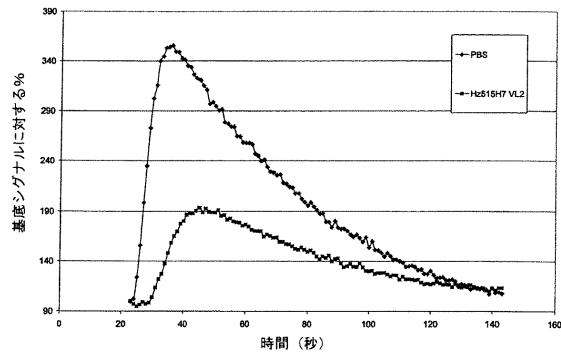
【図35C】



【図35D】



【図36】



【図37A】

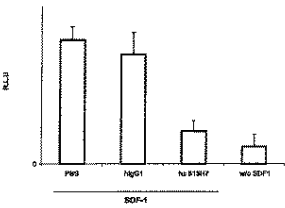
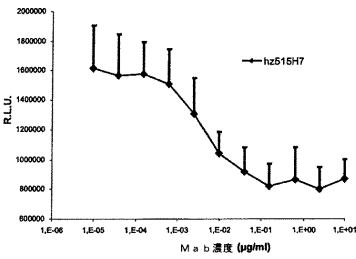
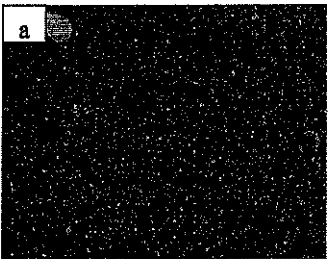


Figure 37A

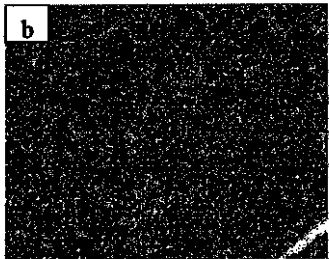
【図37B】



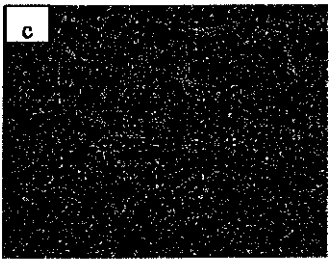
【図38a】



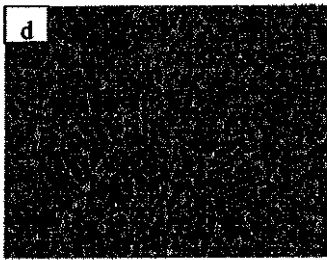
【図38b】



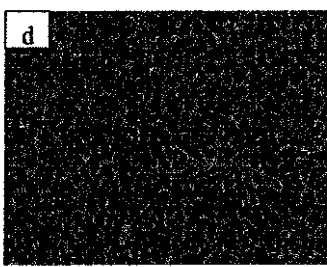
【図38c】



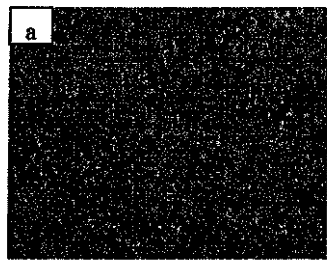
【図38d】



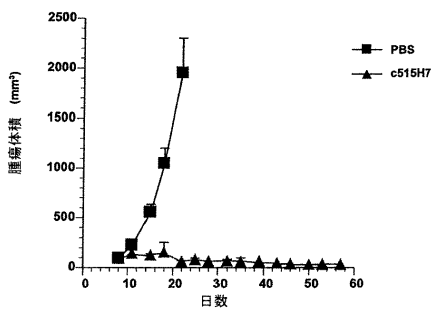
【図39d】



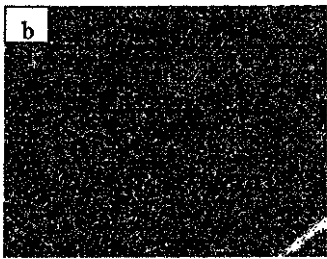
【図39a】



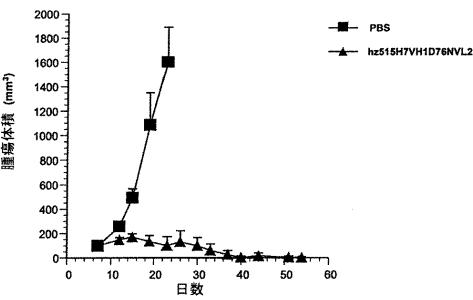
【図40】



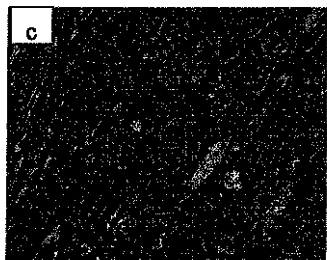
【図39b】



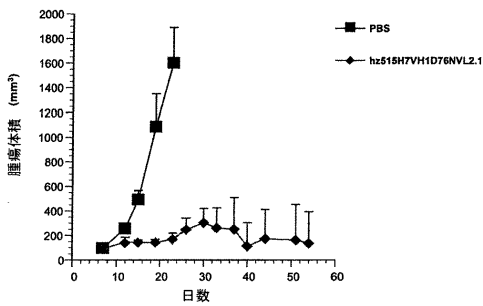
【図41】



【図39c】



【図42】



【配列表】

0005749330000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
A 0 1 K	67/027	(2006.01)	A 0 1 K	67/027	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	E
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
			G 0 1 N	33/574	A

- (72)発明者 クリスティーヌ、クリンゲル - アムール
フランス国グロワジー、レ、ゴターユ、ルウト、ド、シェ、ディオサ、7 3
- (72)発明者 アレクサンドラ、ジュアンオー
フランス国ボヌビル、アンパス、ド、スイゾン、8 3
- (72)発明者 ベロニク、グルニエ - コサネル
フランス国サン、マルタン、デュ、フレスヌ、リュ、ド、ラ、ビ、ド、ロルム、1
- (72)発明者 スペン、ベルガー
フランス国ボワジー、リュ、シャルル、ペロー、1 3 5

審査官 北村 悠美子

- (56)参考文献 Zhonghua Waike Zazhi, 2 0 0 9 年, Vol.47, No.3, p.210-213
四国歯誌, 2 0 0 6 年, Vol.18, No.2, p.195-201
JOURNAL OF VIROLOGY, 2 0 0 5 年, Vol.79, No.3, p.1930-1933

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- C 0 7 K** **1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6**
C 1 2 N **1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0**
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
U n i P r o t / G e n e S e q